

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ljiljana M. Nikolić

**PROMENA AKTIVNOSTI Na^+/K^+ PUMPE
I NJEN UTICAJ NA SPONTANU
BIOELEKTRIČNU AKTIVNOST
NEURONA VIHOGRADSKOG PUŽA
Helix pomatia L. POD DEJSTVOM
MAGNETNOG POLJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ljiljana M. Nikolić

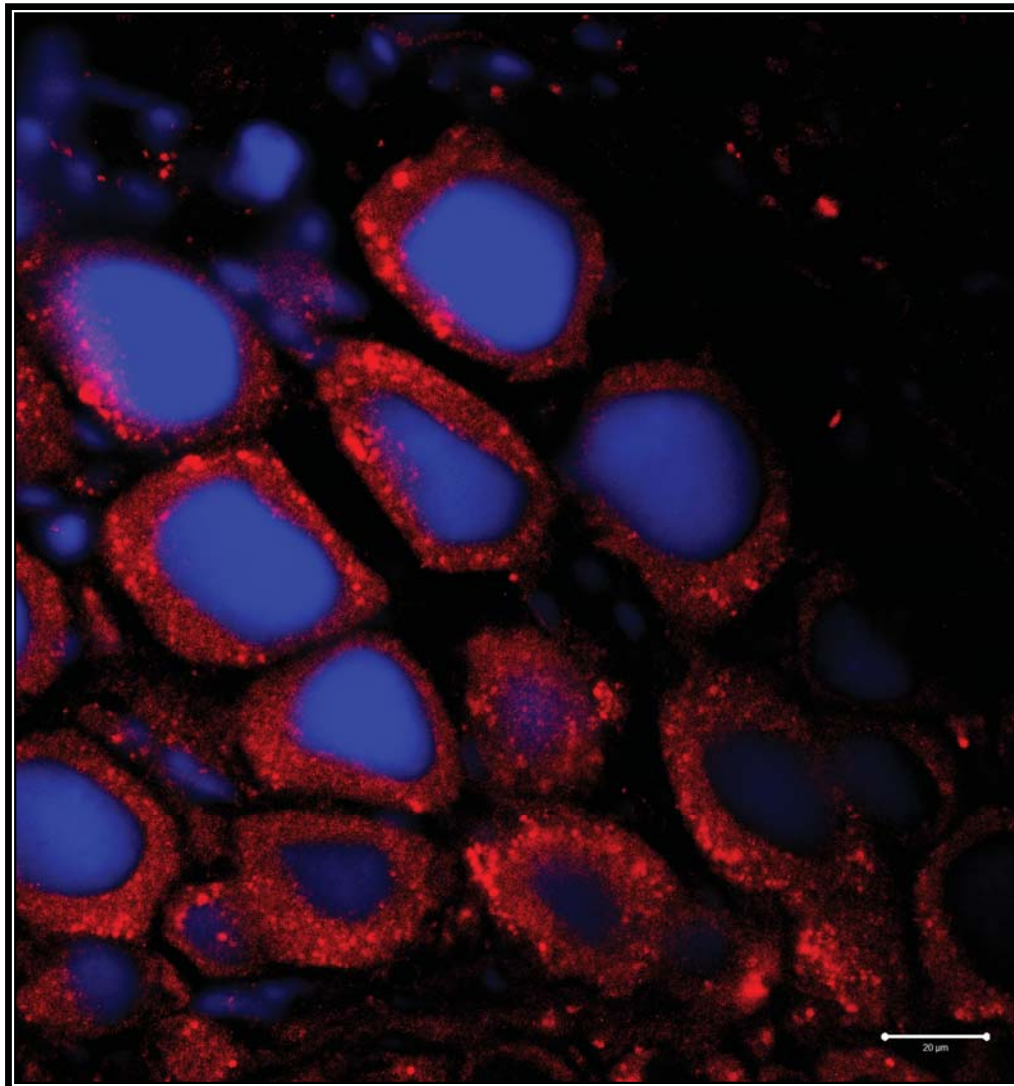
**CHANGE IN THE ACTIVITY OF Na⁺/K⁺
PUMP AND ITS EFFECT ON THE
SPONTANEOUS BIOELECTRIC
ACTIVITY OF NEURON OF THE
GARDEN SNAIL *Helix pomatia* L.
IN THE MAGNETIC FIELD**

Ph.D. Thesis

Belgrade, 2012

“To raise new questions, a new possibility, to regard old questions from a new angle, requires creative imagination and marks real advances in science”

Albert Einstein



Na⁺/K⁺ pumpa (crveno) obeležena u neuronima puža. Jedra ćelija su obeležena DAPI-jem (plavo).
Kalibraciona oznaka odgovara dužini od 20 μm.

Mentori:

dr Miroslav Živić, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Miodrag Nedeljković, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Gordana Kartelija, viši naučni saradnik u penziji, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu

dr Nataša Todorović, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu

dr Joanna Zakrzewska, viši naučni saradnik, Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd

dr Branka Janać, viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković, Univerzitet u Beogradu

Esperimentalna istraživanja ovog rada izvedena su većim delom na Odeljenju za neurofiziologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, u laboratoriji kojom je rukovodila dr Gordana Kartelija, a sada rukovodi dr Branka Janać, a delom u Institutu za Opštu i fizičku hemiju u Beogradu, u NMR laboratoriji.

Zahvaljujem se:

mentorima, dr Miodragu Nedeljkoviću i Miroslavu Živiću na dobronamernim sugestijama prilikom izrade ove doktorske disertacije

dr Gordani Karteliji na pomoći u eksperimentalnom radu, ukazanom poverenju i pruženoj prilici

dr Nataši Todorović koja me je strpljivo učila sagledavanju kompleksnosti eksperimentalne problematike i analiziranju podataka

dr Joani Zaksevskoj na stručnim i prijateljskim savetima

dr Zlatku Proliću, dr Branki Janać, mr Dajani Todorović na svakoj ukazanoj pomoći i razumevanju tokom izrade ove doktorske disertacije

dr Marku Popoviću na svim praktičnim savetima u početnim fazama eksperimentalnog rada, kao i na slanju stručne literature iz Amerike

kolegama sa doktorskih studija, Marini Stanić i Snežani Rauš za pomoć tokom izvođenja biohemijskih eksperimenata, kao i Danijeli Bataveljić za pomoć u imunofluorescentnom obeležavanju preseka

PROMENA AKTIVNOSTI Na^+/K^+ PUMPE I NJEN UTICAJ NA SPONTANU BIOELEKTRIČNU
AKTIVNOST NEURONA VINOGRADSKOG PUŽA *Helix pomatia* L. POD DEJSTVOM
MAGNETNOG POLJA

REZIME

Ispitivanje dejstva umereno jakog statičkog magnetnog polja na bioelektričnu aktivnost neurona ima veliki značaj jer je magnetno polje umerene jačine prisutno u životnoj sredini. Jednako važno je i proučavanje mehanizama delovanja umereno jakog statičkog magnetnog polja na biofizičke osobine membrane neurona usled sve veće terapijske primene ovog polja, s tim što odgovarajuća jačina polja i dužina izlaganja polju tek treba da budu precizno određene.

Uporednim eksperimentima primenom tehnike intracelularne registracije utvrđeno je da kratkotrajno izlaganje (15 min) umereno jakom statičkom magnetnom polju jačine 2,7 mT i 10 mT dovodi do promena bioelektrične aktivnosti spontano aktivnog Br neurona, dok promene nisu uočene kod nemog N1 neurona. Magnetno polje od 2,7 mT povećalo je amplitudu i skratilo trajanje akcionog potencijala, dok je magnetno polje od 10 mT hiperpolarisalo membranu, povećalo amplitudu, smanjilo frekvenciju i trajanje akcionog potencijala Br neurona. Veličine promena ispitivanih parametara zavisile su od jačine magnetnog polja i uočavane su i tokom perioda od 20 min nakon prestanka izlaganja Br neurona polju od 2,7 mT i 10 mT.

Kombinovanim eksperimentima, biohemijskim analizama i ^{31}P NMR spektroskopijom na okoloždrelnom ganglijskom kompleksu kao i tehnikom intracelularne registracije na Br neuronu vinogradskog puža, pronađeno je da kratkotrajno izlaganje (15 min) statičkom magnetnom polju jačine 10 mT povećava aktivnost Na^+/K^+ pumpe. Povećana aktivnost Na^+/K^+ pumpe dovodi do povećanja potrošnje ATP-a, kao i povećanja *pHi* posredstvom povećanja aktivnosti Na^+/H^+ izmenjivača, *pH* regulatornog sistema čija je aktivnost zavisna od gradijenta Na^+ jona koji stvara i održava Na^+/K^+ pumpa. Rezultati elektrofizioloških eksperimenata na Br neuronu u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim na okoloždrelnom ganglijskom kompleksu. Naime, u uslovima kada je pumpa blokirana ouabainom, promene

potencijala mirovanja membrane, trajanja akcionog potencijala i intervala između akcionih potencijala u paketićima, veće su u Br neuronu koji je izlagan magnetnom polju. Na taj način je pokazano da Na^+/K^+ pumpa igra važnu ulogu u uočenim promenama bioelektričnih parametara Br neurona u magnetnom polju jačine 10 mT. Signalni putevi delovanja magnetnog polja na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža uključuju procese fosforilacije i defosforilacije pošto se nakon blokiranja ovih procesa ne može uočiti opisani efekat magnetnog polja.

Ključne reči: spontana bioelektrična aktivnost, statičko magnetno polje, Na^+/K^+ pumpa, intracelularna registracija, puž

Naučna oblast: Neuronauke

Uža naučna oblast: Neurofiziologija sa biofizikom

UDK broj: [591.044 :: [577.352.5+591.181] : 591.481.8]:594.38

CHANGE IN THE ACTIVITY OF Na^+/K^+ PUMP AND ITS EFFECT ON THE SPONTANEOUS BIOELECTRIC ACTIVITY OF NEURON OF THE GARDEN SNAIL *Helix pomatia* L. IN THE MAGNETIC FIELD

ABSTRACT

It is important to investigate the effects of moderate intensity static magnetic field on the bioelectric activity of neurons, since this field is present in the environment. Equally important is to reveal the mechanism of action of moderate intensity static magnetic field on biophysical properties of neuronal membranes, as this field has been applied in disease treatment, whereby proper dosages of exposure still need to be determined.

Comparative intracellular registration studies showed that short term exposure (15 *min*) to the moderate intensity static magnetic field of 2,7 *mT* and 10 *mT* strength changed bioelectric activity of the spontaneously active Br neuron, while bioelectric activity of silent N1 neuron remained unchanged. The 2,7 *mT* magnetic field increased amplitude and decreased duration of action potential, whereas the 10 *mT* magnetic field hyperpolarized membrane potential, increased amplitude, decreased firing frequency and duration of action potential of the Br neuron. The magnitude of change of measured bioelectric parameters depended on the strength of applied magnetic field, and was still observed during the period of 20 *min* after exposure of Br neuron to the 2,7 *mT* and 10 *mT* magnetic field.

Combined experiments, using biochemical analysis and *NMR* spectroscopy on whole snail brains and intracellular registration on Br neuron, showed that short-term exposure (15 *min*) to the 10 *mT* magnetic field increased activity of Na^+/K^+ pump. Increased Na^+/K^+ pump activity in the snail brain caused an increase in *ATP* consumption and increase in the *pHi* which is mediated through an increase in the activity of Na^+/H^+ exchanger, a *pH* regulatory system governed by the gradient of Na^+ ions created and maintained by Na^+/K^+ pump. Electrophysiology from Br neuron is in agreement with the results obtained on the whole snail brain. Magnitude of ouabain

effect measured on the membrane resting potential, action potential and interspike interval duration, was higher in Br neurons exposed to the magnetic field, demonstrating that Na^+/K^+ pump plays an important role in modulation of bioelectric activity of Br neuron caused by 10 mT magnetic field. Pathways through which the magnetic field influenced the Na^+/K^+ pump activity involve phosphorylation and dephosphorylation, as blocking these processes abolished the effect of the static magnetic field.

Key words: spontaneous bioelectric activity, static magnetic field, Na^+/K^+ pump, intracellular registration, garden snail

Scientific field: Neuroscience

Narrower scientific field: Neurophysiology and Biophysics

UDK number: [591.044 :: [577.352.5+591.181] : 591.481.8]]:594.38

SKRAĆENICE

ATP- adenzin trifosfat

ISI – interval između akcionih potencijala u paketiću

MP-magnetno polje

NMR- nuklearna magnetna rezonanca

PKA -protein kinaza A

PKG – protein kinaza G

PME- fosfomonoestri

Pi- neorganski fosfat

PCr- fosfokreatin

V_m- potencijal mirovanja membrane

V_{max}-maksimalna vrednost potencijala mirovanja membrane

8-Br-cGMP- 8-bromoguanozin 3',5'-ciklični monofosfat

8-Br-cAMP - 8 -bromoadenozin 3',5'-ciklični monofosfat

SADRŽAJ

REZIME

ABSTRACT

SKRAĆENICE

UVOD

1

NEURONI PUŽA KAO EKSPERIMENTALNI MODEL -POREĐENJE SA NEURONIMA KIČMENJAKA

1

Tipovi bioelektrične aktivnosti neurona puža 3

Mehanizmi regulacije spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona 5

Na⁺/K⁺ PUMPA

6

Struktura Na⁺/K⁺ pumpe 6

Katalitički ciklus Na⁺/K⁺ pumpe 9

Regulacija aktivnosti Na⁺/K⁺ pumpe 12

Funkcionalni značaj Na⁺/K⁺ pumpe 14

Uloga Na⁺/K⁺ pumpe u regulaciji bioelektrične aktivnosti nadražljivih ćelija 15

MAGNETNO POLJE

16

Značaj istraživanja 16

Osobine magnetnog polja 16

Osobine statičkog magnetnog polja- stalni magneti 17

Pregled mehanizama dejstva statičkog magnetnog polja 18

Statičko magnetno polje u životnoj sredini 19

Uticaj umereno jakog statičkog magnetnog polja na nervni sistem 20

Uticaj na nervni sistem beskičmenjaka 21

Uticaj na nervni sistem kičmenjaka 22

CILJ ISTRAŽIVANJA

23

MATERIJAL I METODE

25

EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE	25
PREPRAVA EKSPERIMENTALNOG OBJEKTA	26
Izolovanje okoždrelnog ganglijskog kompleksa za biohemijske i NMR eksperimente	26
Preparovanje podždrelnog ganglijskog kompleksa za elektrofiziološke eksperimente	26
EKSPERIMENTALNA POSTAVKA ZA IZLAGANJE MAGNETNOM POLJU	27
ELEKTROFIZIOLOŠKI EKSPERIMENTI	30
Sastav rastvora	30
Intracelularna registracija bioelektrične aktivnosti Br i N1 neurona	30
Analiza elektrofizioloških signala	32
BIOHEMIJSKI EKSPERIMENTI	35
Priprema uzoraka za biohemijsku analizu	35
Određivanje aktivnosti Na ⁺ /K ⁺ pumpe	35
Ispitivanje uticaja procesa fosforilacije i defosforilacije na aktivnost Na ⁺ /K ⁺ pumpe	36
Fosfomolibdatni metod određivanja neorganskog fosfata (Pi)	36
Određivanje koncentracije proteina	37
Merenje aktivnosti Na ⁺ /K ⁺ pumpe	37
³¹ P NMR EKSPERIMENTI	38
Merenje fosfatnog metabolizma i pHi u okoždrelnom ganglijskom kompleksu	38
STATISTIČKA ANALIZA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA	39

REZULTATI **40**

UTICAJ MAGNETNOG POLJA JAČINE 2,7 mT I 10 mT NA BIOELEKTRIČNU AKTIVNOST Br i N1 NEURONA	40
Potencijal mirovanja membrane	41
Frekvencija akcionih potencijala	42
Amplituda akcionog potencijala	44
Trajanje akcionog potencijala	46
UTICAJ MAGNETNOG POLJA JAČINE 10 mT NA AKTIVNOST Na ⁺ /K ⁺ PUMPE	48
Uticaj magnetnog polja jačine 10 mT na aktivnost Na ⁺ /K ⁺ pumpe u okoždrelnom ganglijskom kompleksu	49
Biohemijska analiza	49
³¹ P NMR eksperimenti	51
Uticaj magnetnog polja jačine 10 mT na aktivnost Na ⁺ /K ⁺ pumpe u Br neuronu	54
Aktivnost Na ⁺ /K ⁺ pumpe u Br neuronu u kontrolnim uslovima	54

Aktivnost Na ⁺ /K ⁺ pumpe u Br neuronu izloženom magnetnom polju jačine 10 mT	59
UTICAJ 8-Br-cGMP-A NA TRAJANJE AKCIONOG POTENCIJALA Br NEURONA	66
<u>DISKUSIJA</u>	68
PUTEVI DELOVANJA UMERENO JAKOG STATIČKOG MAGNETNOG POLJA	68
PROMENA AKTIVNOSTI Na ⁺ /K ⁺ PUMPE POD DEJSTVOM UMERENO JAKOG STATIČKOG MAGNETNOG POLJA	73
SPECIFIČNOST DELOVANJA UMERENO JAKOG STATIČKOG MAGNETNOG POLJA	81
ZAVISNOST PROMENA BIOELEKTRIČNIH PARAMETARA NEURONA OD JAČINE MAGNETNOG POLJA	82
ZNAČAJ RADA I BUDUĆA ISTRAŽIVANJA	84
<u>ZAKLJUČCI</u>	86
<u>LITERATURA</u>	88
<u>BIOGRAFIJA</u>	107

UVOD

NEURONI PUŽA KAO EKSPERIMENTALNI MODEL -POREĐENJE SA NEURONIMA KIČMENJAKA

Neurone u nervnom sistemu kičmenjaka odlikuju brojnost i funkcionalna raznovrsnost što ih čini kompleksnim modelom za ispitivanja bioelektričnih i funkcionalnih osobina pojedinačnih neurona. Jednostavniji model za takva istraživanja su neuroni beskičmenjaka, među kojima su dosta ispitivani neuroni mekušaca, posebno neuroni puževa. Neuroni puževa različitih rodova *Aplysia*, *Helix*, *Tritonia*, *Lymnea*, poslužili su kao model za utvrđivanje specifičnih bioelektričnih svojstava pojedinačnih neurona, kao i za ispitivanje ćelijskih osnova učenja i pamćenja u neuronskim mrežama. Podaci iz literature ističu nekoliko važnih osobina neurona puža koje ih čine pogodnim modelom za neurofiziološka istraživanja na nivou pojedinačne nervne ćelije (*Strumwasser 1971*, *Rozsa 1984*). Nervni sistem puža sačinjen je od relativno malog broja neurona $\sim 10^4$, što je više miliona puta manje od ukupnog broja neurona sisara $\sim 10^{12}$. Neuroni su organizovani u ganglije, pri čemu ganglije kontrolišu određene oblike ponašanja. Ćelijska tela neurona puža velikih su dimenzija i imaju površinski položaj. Pojedini neuroni su najveći neuroni u životinjskom svetu i dostižu veličinu i do 1000 μm . Neuroni puža imaju stalan položaj u ganglijskom kompleksu i formiraju stalne sinaptičke veze. Ove osobine omogućile su identifikaciju većeg broja neurona, na osnovu njihovih morfoloških, biofizičkih i farmakoloških osobina i ustanovljavanje homologije između neurona različitih vrsta puževa.

Velike dimenzije neurona znatno olakšavaju uvođenje jedne ili više elektroda u telo neurona u tehnikama intracelularne registracije i nametnute voltaže. Još 1955. godine *Arvanitaki* i *Chalazonitis*, kao i *Tauc*, zabeležili su prve zapise intracelularno registrovane bioelektrične aktivnosti neurona morskog puža *Aplysia* (*Arvanitaki i Chalazonitis 1955*, *Tauc 1955*). Od tada, naročito tokom sedamdesetih i osamdesetih godina, elektrofiziološka istraživanja na neuronima puževa pružila su brojna saznanja koja se odnose na transmisiju nervnog impulsa, karakterizaciju bioelektričnih osobina neurona i odgovor neurona na različite farmakološki aktivne supstance.

Relativno jednostavni oblici ponašanja čine puža pogodnim eksperimentalnim modelom za ispitivanje ćelijskih osnova ponašanja. Stalnost položaja tela neurona i stalnost njihovih sinaptičkih veza omogućava identifikaciju grupa neurona tj. neuronskih kola odgovornih za ispoljavanje određenog oblika ponašanja. Najpoznatiji primer je svakako refleks povlačenja škrga kod *Aplysie*, koji je pružio objašnjenje kako se u hemijskoj kaskadi događaja na sinapsama formira kratkotrajna i dugotrajna memorija. Za ova istraživanja 2000. godine *Eric Kandel* dobio je Nobelovu nagradu.

Osobine neurona zavise od mesta koje on zauzima u nervnom sistemu i funkcije koju obavlja. Neuroni se razlikuju u dimenzijama ćelijskih tela, složenosti sinaptičkih kontakata sa susednim ćelijama, kao i funkcionalnim svojstima. Pomenute osobine neurona su znatno raznovrsnije u kičmenjačkom nervnom sistemu u poredjenju sa beskičmenjačkim. Međutim, iako su neuroni kičmenjaka specijalizovaniji tj. kompleksniji u morfološkom i funkcionalnom pogledu, njihova sličnost sa neuronima beskičmenjaka je iznenađujuće velika u pogledu fundamentalnih ćelijskih procesa. Primer za to su nastajanje akcionog potencijala i hemijska sinaptička transmisija, dva najizuzetavnija svojstva neurona. Kod svih životinja ulazne jonske struje nošene Na^+ i Ca^{2+} odgovorne su za depolarizacionu fazu akcionog potencijala, dok je izlazna struja nošena K^+ odgovorna za repolarizacionu fazu akcionog potencijala. Električni signali putem kojih neuroni ostvaruju svoje fiziološke funkcije su vrlo slični kod različitih vrsta i ne postoji način da se sa zapisa akcionog potencijala utvrdi da li signal potiče iz neurona puža, vinske mušice, miša, pacova ili čoveka.

Nervne ćelije su međusobno funkcionalno povezane sinaptičkim vezama. Brojnost i raznovrsnost tipova sinaptičkih veza koje postoje u nervnom sistemu kičmenjaka daleko su veće od onih koje postoje u nervnom sistemu beskičmenjaka. Međutim, mehanizmi delovanja različitih neurotransmitera na sinapsama, kao i bioelektrični odgovor neurona na neurotransmitere slični su kod neurona beskičmenjaka i kičmenjaka. Beskičmenjaci nemaju tako bogat repertoar ponašanja kao kičmenjaci ali ispoljavaju slične osobine kao viši organizmi. I kod beskičmenjaka i kod kičmenjaka neuroni povezani u mreže su odgovorni za ispoljavanje određenog oblika ponašanja, s tim što je broj neurona koji formira ove mreže značajno veći kod kičmenjaka. Otkrića koja se tiču mehanizama formiranja kratkotrajne i dugotrajne memorije opisanih kod

beskičmenjaka, primenjuju se i na mnogo kompleksnije organizme kao što su kičmenjaci.

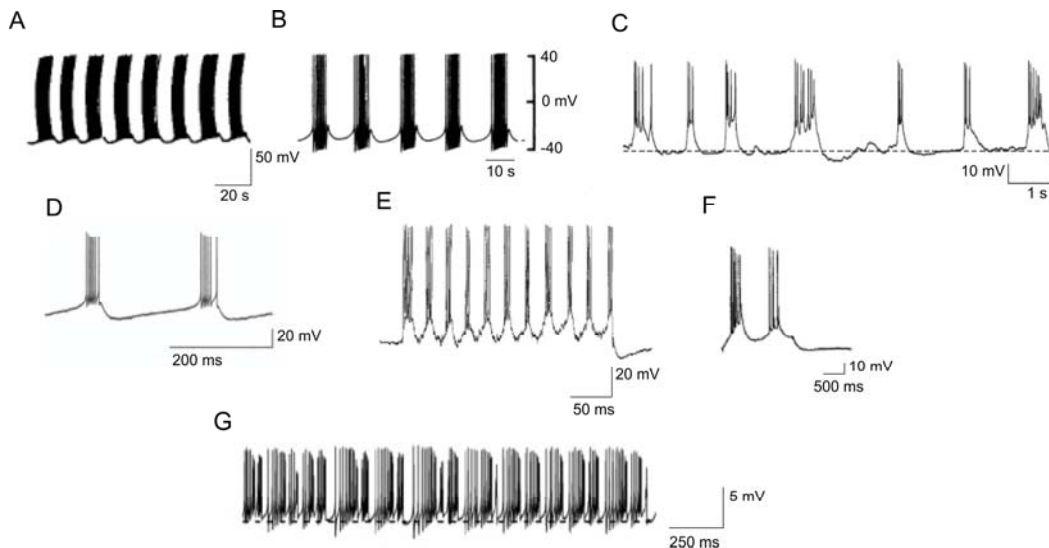
Tipovi bioelektrične aktivnosti neurona puža

Bioelektrična svojstva neurona određuju jonske pumpe i jonski kanali na membrani kao i njegove sinaptičke veze (*Bower i Beeman 1998*). U nervnom sistemu puža, na osnovu bioelektričnih svojstava, mogu se izdvojiti dva tipa neurona. Prvi tip neurona ne generiše spontano akcione potencijale i naziva se nemim neuronima. Kod ovih neurona, u zavisnosti od nivoa nametnute depolarizacije, mogu se izazvati pojedinačni ili serije akcionih potencijala. Drugi tip neurona karakteriše se spontanom generisanjem akcionih potencijala i takvi neuroni nazivaju se spontano aktivnim. Na osnovu rezultata ranijih istraživanja može se reći da je spontana aktivnost dominantna u nervnom sistemu puža, jer većina ispitivanih neurona pokazuje upravo ovaj tip bioelektrične aktivnosti (*Kartelija 1975, Puztai i saradnici 1976*).

Neuroni puža ispoljavaju različite oblike spontane aktivnosti. Razlike se javljaju u frekvenciji akcionih potencijala, akcioni potencijali mogu biti generisani tonično ili u paketićima, njihovo generisanje može biti praćeno sporim ritmičnim promenama potencijala mirovanja membrane. Spontana aktivnost neurona može biti uslovljena sinaptičkim ulazima ili može biti endogenog porekla. Endogeno aktivni tj. autoaktivni neuroni generišu akcione potencijale u odsustvu bilo kakvih sinaptičkih ulaza i takvi neuroni igraju ulogu predvodničkih elemenata u neuronskoj mreži (*Tauc 1967, Alving 1968*). Endogena aktivnost može biti modulirana sinaptičkim ulazima sa drugih neurona, čime se endogeni bioelektrični ritam prilagođava specifičnim fiziološkim zahtevima (*Benson i Adams 1987*). Ovaj tip aktivnosti prvi put je opisan kod R15 neurona morskog puža *Aplysia* (*Alving 1968*), zasigurno jednom od najispitivanijih neurona u fiziološkim istraživanjima. Nesto kasnije, opisana je i spontana aktivnost Br (Rpal) neurona vinogradskog puža i utvrđena je velika sličnost sa bioelektričnim svojstvima R15 neurona (*Sakharov i Salanki 1969*). Kod pomenutih neurona spontano generisani akcioni potencijali se javljaju ritmično, u vidu paketića različitog trajanja koji se smenjuju sa intervalima između paketića tokom kojih ne dolazi do generisanja akcionih potencijala, pa se ovaj tip električne aktivnosti naziva i bimodalnom ili intermitentnom. Bimodalnu aktivnost karakterišu spore, ritmične promene potencijala

mirovanja membrane neurona. Hiperpolarišuće i depolarišuće ritmične oscilacije membranskog potencijala tokom depolarizacione faze oscilacija dovode do nastanka akcionih potencijala, a tokom hiperpolarišuće faze oscilacija do nastanka intervala između paketića akcionih potencijala (Gola 1976, Mathieu i saradnici 1976).

Nastajanje akcionih potencijala u paketićima ima posebnu ulogu u nervnom sistemu, jer obezbeđuje efikasniji prenos informacija u odnosu na pojedinačne akcione potencijale (Lisman 1997). Smatra se da su neuroni sa ovakvim oblikom spontane aktivnosti neurosekretorne ćelije (Kai-Kai 1979), a poznato je da postoje ćelije sa sličnim svojstvima bioelektrične aktivnosti i neurosekretornom ulogom i u hipofizi kičmenjaka (Stojilković 2006). Osim neurona puža, spontana bimodalna bioelektrična aktivnost je svojstvo i neurona drugih beskičmenjaka (Harris-Warrick i Flamm 1987, Beck i saradnici 2001, Yang i saradnici 2011), kao i kičmenjaka (Gahwiler i Dreifuss 1979, Hablitz i Johnston 1981, Bal i McCormick 1993, Brumberg i saradnici 2000, Womack i Khodakhah 2004). Primeri bimodalne aktivnosti različitih neurona u nervnom sistemu beskičmenjaka i kičmenjaka predstavljeni su na Slici 1.



Slika 1. Spontana bioelektrična aktivnost neurona beskičmenjaka i kičmenjaka. Bimodalni ritam karakteriše spontano generisanje paketića akcionih potencijala i intervala između paketića tokom kojih ne dolazi do stvaranja akcionih potencijala. A. Br neuron vinogradskog puža (preuzeto iz Kononenko 1993). B. R15 neuron *Aplysie* (preuzeto iz Levitan i sar. 1987). C. Interneuron *Drosophile* (preuzeto iz Yang i sar. 2011). D. Neuron u talamusu morskog praseta (preuzeto iz Bal i McCormick 1993). E. Kortikalni neuron lasice (preuzeto iz Brumberg i sar. 2000). F. Piramidalni neuron u hipokampusu pacova (preuzeto iz Su i sar. 2001). G. Purkinjeov neuron u cerebelumu pacova (preuzeto iz Womack i Khodakhah 2004).

U nervnom sistemu beskičmenjaka i kičmenjaka neuroni koje odlikuje bimodalna aktivnost, kao i neuronske mreže koje ovi neuroni formiraju, imaju ulogu u

regulaciji ponavljajućih radnji kao što su srčana ritmika, odbrambeni refleksi, uzimanje hrane, kretanje, disanje, regulacija ciklusa budnost-spavanje.

Mehanizmi regulacije spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona

Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se reći da je Br neuron jedan od najispitivanijih neurona u nervnom sistemu vinogradskog puža (*Ayrapetyan 1976, Vadasz i Salanki 1976, Zečević i Levitan 1980, Elekes i saradnici 1983, Kononenko 1979a i 1979b, 1993, Nedeljković i saradnici 2005*). Ranija istraživanja pokazala su da R15 neuron učestvuje u regulaciji srčane ritmike, reproduktivnog ponašanja i sastava hemolimfe (*Jahan-Parwar i saradnici 1969, Rittenhouse i Price 1985, Alevizos i saradnici 1991*). Ove funkcije se mogu pripisati i Br neuronu zbog izrazite homologije sa R15 neuronom. Mehanizmi koji se nalaze u osnovi regulacije bimodalne spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona ili njegovog homologa R15 neurona bili su predmet intenzivnih fizioloških istraživanja sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka. Značajna uloga u regulaciji ritmične bimodalne aktivnosti pripisivana je Na^+/K^+ pumpi (*Strumwasser 1968, Ayrapetyan 1973, 1976*). Naime, depolarizacija membrane i nastajanja paketića akcionih potencijala dovodi do povećanja intracelularne koncentracije Na^+ jona i narušavanja potencijala mirovanja membrane neurona što dovodi do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ pumpe. Povećana aktivnost pumpe potom dovodi do ponovnog uspostavljanja potencijala mirovanja membrane. Na taj način ciklične promene u aktivnosti pumpe učestvuju u regulaciji hiperpolarišućih intervala između paketića akcionih potencijala, a samim tim i u regulaciji oscilacija potencijala membrane koje prate bimodalni ritam Br neurona. Inhibicija Na^+/K^+ pumpe ouabainom u Br neuronu dovodi do depolarizacije membrane neurona, postepenog skraćivanja intervala između paketića akcionih potencijala i na kraju do prelaska bimodalnog ritma u tonični. Međutim, u uslovima kada je Na^+/K^+ pumpa blokirana ouabainom bilo je moguće ponovo uspostaviti bimodalni ritam hiperpolarišućim stimulusima. Takvi podaci ukazivali su na činjenicu da su pored pumpe i neki drugi mehanizmi uključeni u regulaciju bimodalne aktivnosti Br neurona. U skladu sa tim, *Junge i Stephens (1973)* su pokazali da tokom hiperpolarišućih promena potencijala membrane R15 neurona dolazi do cikličnog povećanja provodljivosti membrane pretežno za jone K^+ .

Značajnu ulogu u regulaciji bimodalne aktivnosti Br i R15 neurona ima i intracelularna koncentracija Ca^{2+} i Ca^{2+} zavisne I_{Ca} , $I_{K(Ca)}$, i $I_{katjon(Ca)}$ struje (*Ewald i Levitan 1987, Hille 2001*). Upotrebom Ca^{2+} osetljivih boja pokazano je da koncentracija Ca^{2+} u ćeliji - $[Ca^{2+}]_i$ tokom stvaranja paketića akcionih potencijala raste, a u intervalima između paketića opada. Tokom nastanka paketića, depolarizacija membrane aktivira ulaznu I_{Ca} struju što dovodi do povećanja $[Ca^{2+}]_i$. Povećana $[Ca^{2+}]_i$ potom aktivira $I_{katjon(Ca)}$ struju što vodi ka povećanju frekvencije akcionih potencijala u paketićima. Do prestanka generisanja paketića akcionih potencijala dolazi usled povećane $[Ca^{2+}]_i$ koja inaktivira I_{Ca} i aktivira izlaznu $I_{K(Ca)}$ struju.

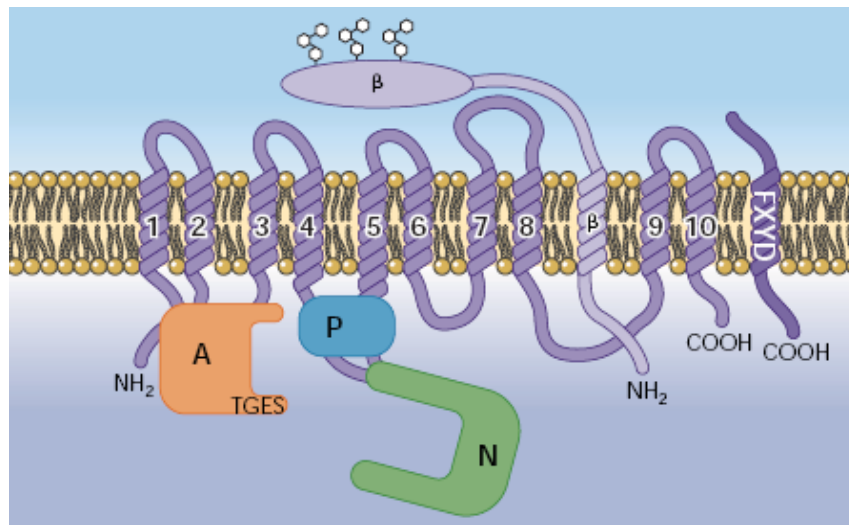
Na⁺/K⁺ PUMPA

Godine 1957, *Jens Skou* je ispitivao efekte različitih katjona na homogenatima nerava kraba ulovljenim na obalama Danske. Rezultati istraživanja naveli su ga na ideju da postoji enzim koji transportuje Na^+ i K^+ kroz ćelijsku membranu koristeći adenzin trifosfat –*ATP* (*Skou 1957*). U isto vreme u Americi, na *Vanderbilt* Univerzitetu, *Robert Post* se bavio ispitivanjem aktivnog transporta Na^+ i K^+ na membranama eritrocita i otkrio je da se prilikom transporta tri jona Na^+ izbacuju van ćelije i dva jona K^+ ubacuju u ćeliju (*Post i Jolly 1957*). U saradnji sa *Postom*, *Skou* je otkrio da ista stehiometrija transporta Na^+ i K^+ postoji i u nervima krabe, kao i da je enzim odgovoran za ovaj transport osetljiv na srčani glikozid ouabain. Četrdeset godina kasnije ova otkrića donela su *Skou* Nobelovu nagradu za otkriće enzima poznatog kao Na^+/K^+ -ATPaza. Danas se zna da je Na^+/K^+ -ATPaza (Na^+/K^+ pumpa) prisutna na membranama svih životinjskih ćelija i da je njena osnovna funkcija stvaranje i održavanje gradijenta Na^+ i K^+ jona sa obe strane ćelijske membrane na račun hidrolize *ATP*-a, sa stehiometrijom $3Na^+/2K^+/1ATP$. Pored toga, do danas su u znatnoj meri odgonetnuti detalji strukture, katalitičkog ciklusa transporta jona i funkcionalnog značaja ove membranske pumpe.

Struktura Na⁺/K⁺ pumpe

Na^+/K^+ pumpa je oligomer koji čine α i β subjedinica. Subjedinica α je membranski protein koji ima katalitičku i transportnu funkciju (Slika 2). Ova subjedinica ima više domena koji su označeni kao **M**, **A**, **N** i **P** domeni (*Jorgensen i*

saradnici 2003, Kuhlbrandt 2004, Horisberger 2004). Strukture i funkcije svih domena su u velikoj meri istražene. Membranski **M** domen sačinjen je od 6 do 10 transmembranskih segmenata, koji okružuju mesta vezivanja Na^+ i K^+ jona. Najmanji citoplazmatični **A** domen obuhvata N terminalni deo polipeptidnog lanca i ima ulogu u procesu defosforilacije. Nukleotidni **N** citoplazmatični domen, obuhvata distalni deo intracelularne petlje između četvrtog i petog transmembranskog segmenta. Ovaj domen formira vrstu džepa tj. mesta za vezivanje *ATP*-a. Citoplazmatični **P** domen obuhvata proksimalni deo intracelularne petlje između četvrtog i petog transmembranskog segmenta. U ovom domenu nalazi se asparaginska kiselina za čiji se bočni lanac vezuje fosfatna grupa koja nastaje hidrolizom *ATP*-a. Manja, regulatorna, β subjedinica ima jedan transmembranski segment, kratki intraćelijski N terminus i veliki glikozilisani ekstracelularni domen. Transmembranski segment β subjedinice smešten je u blizini veće ekstracelularne petlje koja se formira između sedmog i osmog transmembranskog segmenta α subjedinice (Slika 2).



Slika 2. Struktura Na^+/K^+ -ATP-aze. Prikazane su α subjedinica sa označenim transmembranskim segmentima (1-10), citoplazmatičnim A, P i N domenima, β i γ (FXYD sekvenc) subjedinice, preuzeto od Horisberger 2004.

Subjedinica β je neophodna za aktivnost Na^+/K^+ pumpe. Kod kičmenjaka ova subjedinica ima ulogu u stabilizaciji α subjedinice i njenom dopremanju od mesta sinteze unutar ćelije do ćelijske membrane (McDonough i saradnici 1990, Chow i saradnici 1995). Subjedinica β sadrži tri disulfidna mosta koje grade amino kiseline cisteini i narušavanje bilo kog od disulfidnih mostova dovodi do gubitka katalitičke

aktivnosti Na^+/K^+ pumpe (*Beggah i saradnici 1997*). Dugo se smatralo da samo α i β subjedinice predstavljaju gradivne komponente enzima Na^+/K^+ -ATP-aze, međutim novija istraživanja na sisarima pokazala su da je i γ subjedinica sastavni deo enzima (*Mercer i saradnici 1993, Crambert i Geering 2004*). Iako uloga γ subjedinice nije u potpunosti poznata, zna se da je u pitanju mali hidrofobni polipeptid sa visoko konzervisanom FXYD sekvencom u čiji sastav ulaze amino kiseline fenilalanin, tirozin i asparaginska kiselina (Slika 2).

Katalitička subjedinica α može postojati u više izoformi ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ izoforme) kako kod beskičmenjaka tako i kod kičmenjaka (*Blanco i Mercer 1998*). Slično i β subjedinica se javlja u više izoformi ($\beta 1$ i $\beta 2$ izoforme). Različite izoforme nastaju kao posledica ekspresije različitih gena koji kodiraju ove subjedinice i kao rezultat transkripcionih i translacionih modifikacija. Zahvaljujući postojanju izoformi α i β subjedinica, kao i udruživanju različitih izoformi subjedinica u različite $\alpha\beta$ heterodimere, javljaju se fine razlike u afinitetu enzima prema katjonima i ATP-u čime se aktivnost Na^+/K^+ pumpe prilagođava specifičnim fiziološkim zahtevima različitih ćelija.

Uprkos postojanju različitih izoformi subjedinica, Na^+/K^+ pumpa je visoko konzervisan protein. Poređenjem amino kiselinskih sekvenci $\alpha 1$ i $\alpha 2$ izoformi različitih vrsta pronađena je sličnost od ~92% dok je za $\alpha 3$ izoformu ova sličnost veća od 96% (*Blanco i Mercer 1998*). Najveće razlike u strukturi između α izoformi javljaju se u N terminusu polipeptidnog lanca, mestu vezivanja ouabaina, kao i u nekim delovima citoplazmatičnog dela lanca. Suprotno, visoka sličnost među izoformama postoji u citoplazmatičnim domenima subjedinice i u COOH terminusu (*Mercer 1993, Levenson 1994, Lingrel i Kuntzweiler 1994*). Sličnost između izoformi β subjedinica je manja u poređenju sa katalitičkom subjedinicom Na^+/K^+ pumpe. Poređenjem amino kiselinskih sekvenci $\beta 1$ i $\beta 2$ izoformi različitih vrsta pronađena je sličnost od ~60% (*Blanco i Mercer 1998*).

Na Slici 3 prikazane su poređane amino kiselinske sekvence hidrolitičkog regiona N domena α subjedinice čoveka i različitih vrsta koje se često koriste u eksperimentalnim istraživanjima. Sličnost između poređenih sekvenci je veća od 70%.

Takvi podaci pokazuju da su razlike u strukturi Na⁺/K⁺ pumpe različitih vrsta relativno male, imajući u vidu velike razlike između poređenih vrsta u filogenetskog smislu.

```

      Helix pomatia MLCNRAEFKVGQDNVPLKRECNGDASESALLKCVELSIGNVTEYRRRNK 50
Drosophila melanogaster TLCNRAEFKGGQDGVPIPKKEVSGDASEAALLKCMELALGDVMNIRKRNK 50
      Rattus norvegicus -LCNRAVFKGGQDNIPVLKRDVAGDASESALLKCIELSSGSKLMRERNK 49
      Homo sapiens -LCNRAVFKGGQDNIPVLKRDVAGDASESALLKCIELSSGSKLMRERNK 49
      Xenopus -LCNRAVFQAGQENTPILKRDVAGDASESALLKCIELCCGSVRDMREKNH 49
      Mus musculus -LCNRAVFQANQENLPILKRAVAGDASESALLKCIEVCCGSVMEEMREKYS 49
      ***** *: .*: . *:***: *****:*****:*. . *. * * .*:

      KICEIPFNSTNKYQVSIHETEDPNDPRYLLVMKGAPERIMDRCSI 96
      KIAEVPFNSTNKYQVSIHETEDTNDPRYLLVMKGAPERILERCSTI 96
      KVAEIPFNSTNKYQLSIHETEDPNDNRYLLVMKGAPERILDRCATI 95
      KVAEIPFNSTNKYQLSIHETEDPNDNRYLLVMKGAPERILDRCSTI 95
      KVAEIPFNSTNKYQLSVHKANPSESRYILVMKGAPERILDRCTSI 95
      KIVEIPFNSTNKYQLSIHKNPASEPKHLLVMKGAPERILDRCSSI 95
      *: *:*****:*.*: .: .: :*:*****:*.*:
  
```

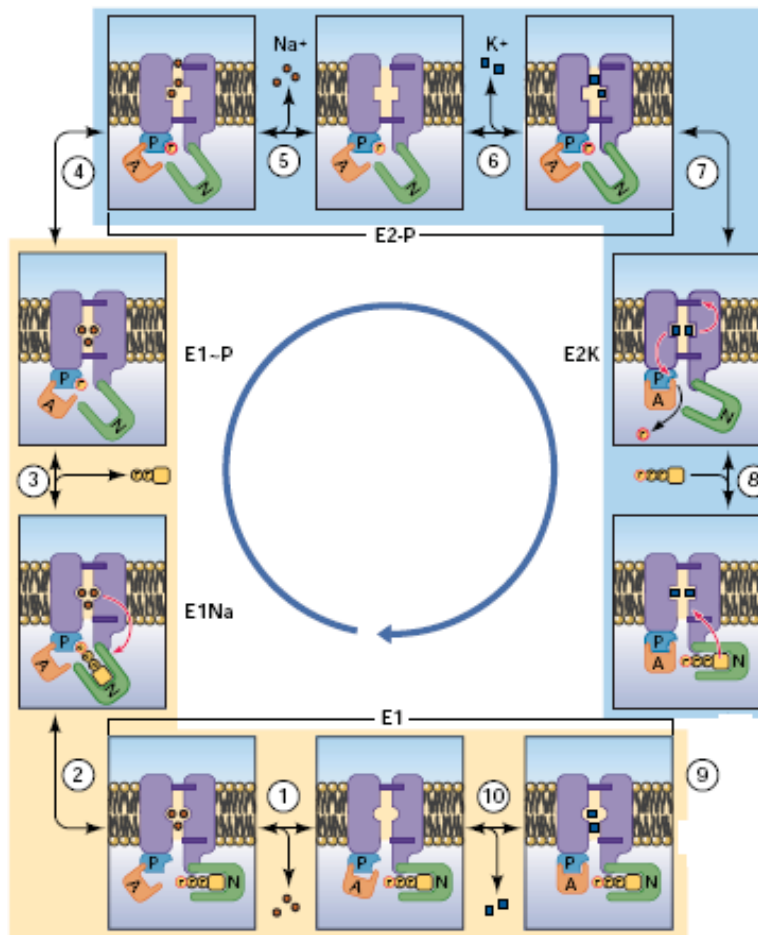
Slika 3. Poređenje amino kiselinskih sekvenci hidrolitičkog regiona N domena α subjedinice Na⁺/K⁺ pumpe različitih vrsta. Sekvence su poređene pomoću CLUSTAL W programa. Označene su amino kiseline koje su iste u svim sekvencama –“*” i pozicije u sekvencama gde se dogodila zamena sličnom amino kiselinom –“:” i “.”.

Katalitički ciklus Na⁺/K⁺ pumpe

Na⁺/K⁺ pumpa pripada P grupi katjonskih pumpi (fosfatne pumpe) koje transportuju različite katjone - H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ i Cd²⁺ (Lutsenko i Kaplan 1995). Tokom katalitičkog ciklusa dolazi do fosforilacije bočnog lanca asparaginske kiseline u α subjedinici enzima usled čega je čitava grupa enzima i dobila naziv P-ATP-aze. Ovoj grupi enzima pripadaju Ca²⁺-ATP-aze na plazma membrani i sarkoplazmatičnom retikulumu, gastrične H⁺/K⁺-ATP-aze, H⁺-ATP-aze kod bakterija i gljiva, bakterijske Mg²⁺-ATP-aze, kao i ATP-aze koje transportuju jone prelaznih metala (Kuhlbrandt 2004). Sve P pumpe transportuju katjone nasuprot gradijentu njihove koncentracije na račun hidrolize ATP-a. Takođe, sve P-pumpe prolaze kroz velike konformacione promene tokom transporta jona (Jorgensen 1975). Dva osnovna konformaciona stanja E1 i E2, međusobno se razlikuju u afinitetima prema jonima koje transportuju i afinitetu prema ADP-u i ATP-u. Transport jona, kao i odgovarajuća konformaciona stanja koja prate ovaj transport vrlo su slični za sve P pumpe.

Na Slici 4 prikazani su koraci (1-10) kroz koje se odvija katalitički ciklus Na⁺/K⁺ pumpe (Horisberger 2004). Učinak jednog katalitičkog ciklusa sastoji se u izbacivanju 3Na⁺ iz ćelije i ubacivanju 2K⁺ u ćeliju uz utrošak jednog molekula ATP-a. Joni Na⁺ i K⁺ se transportuju preko plazma membrane nasuprot gradijentu njihove koncentracije, čime se koncentracija Na⁺ u ćeliji održava niskom dok se koncentracija

K^+ održava visokom. Katalitički ciklus otpočinje vezivanjem $3Na^+$ jona za specifično mesto u membranskom domenu kada je enzim u E1 konformacionom stanju (korak 1). Vezivanje $3Na^+$ sa citoplazmatske strane dovodi do konformacionih promena enzima (korak 2, E1Na konformaciono stanje). Najpre dolazi do rotacije N domena čime se γ fosfatna grupa *ATP*-a pozicionira blizu mesta fosforilacije u P domenu. Zatim dolazi do fosforilacije bočnog lanca asparaginske kiseline u P domenu pumpe. Domen A rotira za približno 30° što onemogućava dalje vezivanje Na^+ sa citoplazmatske strane, oslobađa se *ADP* i enzim prelazi u E1-P konformaciono stanje (korak 3). E1-P stanje brzo prelazi u E2-P konformaciono stanje (korak 4).



Slika 4. Šematski prikaz katalitičkog ciklusa Na^+/K^+ pumpe. Označena su E1, E1Na, E1-P, E2-P i E2K konformaciona stanja kroz koja enzim prolazi tokom katalitičkog ciklusa transporta jona Na^+ i K^+ . Simboli A, N i P predstavljaju domene katalitičke α subjedinice, dok brojevi od 1-10 označavaju korake katalitičkog ciklusa. Preuzeto od *Horisberger 2004*.

U E2-P stanju dolazi do konformacione promene koja omogućava prolaz Na^+ u ekstraćelijsku sredinu. Joni Na^+ se oslobađaju i vezujuće mesto postaje upražnjeno

(korak 5). U sledećem koraku za ovo mesto u membranskom domenu vezuju se $2K^+$ (korak 6). Vezivanje jona K^+ sa ekstracelularne strane membrane dovodi do konformacionih promena enzima (korak 7, $E2K$ konformaciono stanje). U ovom koraku dolazi do defosforilacije bočnog lanca asparaginske kiseline što vodi konformacionoj promeni koja onemogućava dalje vezivanje K^+ sa ekstracelularne strane. Za **N** domen se vezuje *ATP* (korak 8) i enzim prelazi u $E1$ konformaciono stanje koje omogućava prolaz K^+ u intracelularnu sredinu (korak 9). Joni K^+ se oslobađaju (korak 10), vezujuće mesto za jone postaje ponovo upražnjeno i spremno za otpočinjanje novog ciklusa.

Aktivnost Na^+/K^+ pumpe, kao i njen prelazak u fosforilisano $E1P$ stanje regulisani su jonima Mg^{2+} (*Flatman i Lev 1981*). Transport Na^+ i K^+ jona je energetski zahtevan proces. Zavisno od tipa ćelije, Na^+/K^+ pumpa je odgovorna za potrošnju od 5-40% ukupnog *ATP*-a u ćeliji (*Ramnanan i Storey 2006*). Posredstvom Na^+/K^+ pumpe tokom jedne sekunde odigra se približno sto ciklusa transporta jona (*Gadsby i saradnici 2009*). Kako se po ciklusu $3Na^+$ izbacuju a $2K^+$ jona ubacuju u ćeliju, Na^+/K^+ pumpa je elektrogena i struja koja se generiše aktivnošću pumpe je izlazna struja.

Katalitički ciklus Na^+/K^+ pumpe narušavaju specifični inhibitori. Posebnu grupu inhibitora koji su našli praktičnu primenu u medicini predstavljaju srčani glikozidi. Neki od njih su ouabain, strofantidin, ouabagenin, dihidroouabain, aktodigin, digoksin i resibufogenin (*Ruch i saradnici 2003, Wang i Huang 2006*). Vezivno mesto inhibitora je petlja koja se formira između 5. i 6. transmembranskog segmenta sa ekstracelularne strane plazma membrane (*Horisberger 2004*). Smatra se da se inhibitori vezuju za Na^+/K^+ pumpu kada se ona nalazi u $E2-P2Na^+$ i $E2-P2K^+$ konformacionim stanjima i zadržavaju je u tim konformacijama čime sprečavaju transport jona (*Heyse i saradnici 1994*). Osetljivost Na^+/K^+ pumpe prema srčanim glikozidima je različita i specifična za vrstu (*Godfraind 1984*). Ispitivanja na srčanom tkivu različitih vrsta pokazala su da je Na^+/K^+ pumpa čoveka osetljivija na srčane glikozide od pumpe mačke ili psa, dok je najmanja osetljivost pumpe prema glikozidima nađena kod pacova.

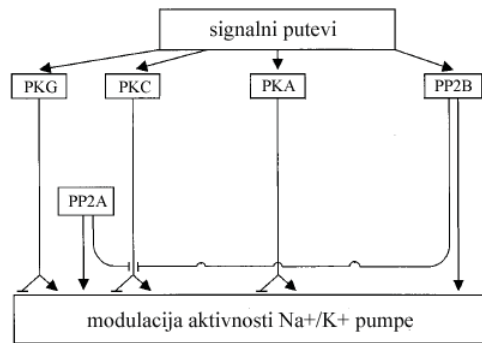
Nasuprot srčanim glikozidima koji blokiraju transport Na^+ i K^+ jona, palitoksin narušava katalitički ciklus Na^+/K^+ pumpe pretvarajući je u katjonski kanal (*Horisberger 2004, Gadsby i saradnici 2009*). Palitoksin se vezuje za pumpu kada je ona u $E2-P$

konformacionom stanju i narušava kontrolisano vezivanje i oslobađanje Na^+ i K^+ jona. Vezivanje palitoksina ne narušava afinitet pumpe prema jonima, ali se tokom jedne sekunde milioni Na^+ i K^+ jona transportuju sa obe strane plazma membrane.

Regulacija aktivnosti Na^+/K^+ pumpe

Regulacija aktivnosti Na^+/K^+ pumpe je veoma složena jer se regulatorni putevi međusobno prepliću, njihov uticaj na aktivnost pumpe je tkivno specifičan i specifičan za određene izoforme enzima (*Therien i Blostein 2000*). Zahvaljujući postojanju različitih mehanizama regulacije, aktivnost pumpe se prilagođava specifičnim fiziološkim potrebama različitih tkiva. Postoje dugotrajni i kratkotrajni mehanizmi regulacije aktivnosti Na^+/K^+ pumpe. Dugotrajna regulacija podrazumeva metaboličke i signalne puteve koji su odgovorni za sintezu ili razgradnju samog enzima. Kratkotrajna regulacija, o kojoj će biti više reči, podrazumeva metaboličke promene u ćeliji koje utiču na aktivnost pumpe, kao i promene u signalnim putevima koji regulišu aktivnost Na^+/K^+ pumpe.

Na aktivnost Na^+/K^+ pumpe neposredno utiču koncentracije njenih substrata, Na^+ i *ATP*-a sa citoplazmatične strane kao i koncentracija K^+ jona sa ekstracelularne strane membrane. Promene u fluidnosti membrane takođe mogu uticati na aktivnost Na^+/K^+ pumpe (*Marcus i saradnici 1986, Kimelberg i Papahadjopoulos 1972, Kimelberg i Mayhew 1975, Giraud i saradnici 1981, Johannsson i saradnici 1981*). Interakcija sa proteinima citoskeleta važna je za pravilan transport i integraciju Na^+/K^+ pumpe na odgovarajuća mesta u plazma membrani (*Therien i Blostein 2000*). Aktivnost Na^+/K^+ pumpe može biti modulirana procesima fosforilacije posredstvom *cAMP* zavisne protein kinaze A, *cGMP* zavisne protein kinaze G, protein kinaze C, kao i procesima defosforilacije posredstvom protein fosfataza (*Therien i Blostein 2000*). Dodavanje ili uklanjanje kovalentno vezane fosfatne grupe u signalnim putevima posredovanim procesima fosforilacije i defosforilacije može povećati i smanjiti aktivnost pumpe (Slika 5). Kinaze i fosfataze mogu direktno delovati na α subjedinicu Na^+/K^+ pumpe, ili mogu ispoljiti svoj efekat preko sekundarnih modulatora kao što su Ca^{2+} joni ili azot oksid-*NO* (*Therien i Blostein 2000, Mobasheri i saradnici 2000*).



Slika 5. Modulacija aktivnosti Na^+/K^+ pumpe signalnim putevima regulisanim procesima fosforilacije i defosforilacije. Predstavljen je uticaj protein kinaze A (PKA), protein kinaze G (PKG), protein kinaze C (PKC) i protein fosfataza (PP2A i PP2B) na aktivnost pumpe kao i međusobna povezanost signalnih puteva (modifikovano iz *Therien i Blostein 2000*).

U nervnom sistemu isti sekundarni glasnici, *cAMP* i *cGMP*, mogu imati različit uticaj na aktivnost Na^+/K^+ pumpe, što zavisi od toga koja izoforma α subjedinice preovlađuje u određenim ćelijama nervnog sistema (Tabela 1).

Tabela 1. Regulacija aktivnosti Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu posredstvom procesa fosforilacije i defosforilacije

Regulacija aktivnosti Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu			
Ekperimentalni model	Fosforilacija/ Defosforilacija	Efekat	Izvori iz literature
Taktilni senzorni neuroni pijavice	<i>cAMP</i>	↓	<i>Catarsi i sar. 1993</i>
Kortikalni astrociti miša u kulturi	<i>cAMP</i>	↑	<i>Peng i sar. 1997</i>
Švanove ćelije pacova u kulturi	<i>cAMP</i>	↑	<i>Stewart i sar. 1998</i>
Hipokampus miša	<i>cAMP</i>	↓	<i>Wu i sar. 2006</i>
Cerebelarni preseci pacova	<i>cGMP</i>	↑	<i>Nathanson i sar. 1995</i>
Endotelijalne ćelije u mozgu miša	<i>cGMP</i>	↓	<i>Pontiggia i sar. 1998</i>
Horioidni pleksus govečeta	<i>cGMP</i>	↓	<i>Ellis i sar. 2000</i>
Striatum pacova	<i>cGMP</i>	↑	<i>Munhoz i sar. 2005</i>
Cereberalni neuroni pacova u kulturi	Protein fosfataza 1	↑	<i>Marcaida i sar. 1996</i>
Kortikalni astrociti pacova u kulturi	Ca^{2+} regulisana protein fosfataza	↑	<i>Hosoi i sar 1997</i>
Horioidni pleksus pacova	Ca^{2+} regulisana protein fosfataza	↑	<i>Fisone i sar 1998</i>

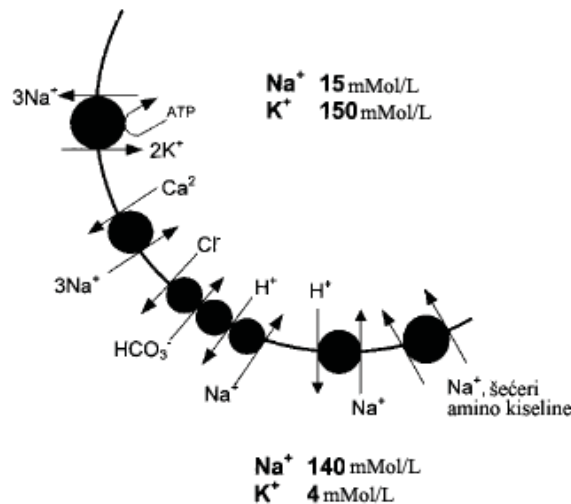
Efekti fosforilacije i defosforilacije na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u različitim eksperimentalnim modelima. Označene su promene u aktivnosti pumpe, povećanje „↑“ i smanjenje „↓“ aktivnosti.

Na primer, u endotelijalnim ćelijama u kojima preovlađuje $\alpha 1$ izoforma pumpe, uticaj *cGMP*-a na aktivnost pumpe je inhibitoran (*Pontiggia i saradnici 1998*). Suprotno, u

Purkinjeovim neuronima u kojima preovlađuju $\alpha 2$ i $\alpha 3$ izoforme, *cGMP* dovodi do povećanja aktivnosti pumpe (*Nathanson i saradnici 1995*). Prema podacima iz literature (Tabela 1), procesi defosforilacije dovode isključivo do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu,.

Funkcionalni značaj Na^+/K^+ pumpe

Gradijente Na^+ i K^+ jona između citoplazme i ekstraćelijske sredine stvara i održava Na^+/K^+ pumpa. Posredstvom pumpe koncentracija Na^+ jona održava se ~10 puta nižom, dok se koncentracija K^+ jona održava ~20 puta višom u ćeliji nego van ćelije (Slika 6). Aktivnost Na^+/K^+ pumpe (Slika 6) utiče na aktivnost Na^+ zavisnih transportera i sa njima udruženo učestvuje u regulaciji intracelularne pH (pH_i), koncentracije Ca^{2+} u ćeliji i transporta šećera i amino kiselina (*Kim i saradnici 1987, Madshus 1988, Mobasheri 2000, Therien i Blostein 2000, Glitsch 2001, McCormick 2008*). Aktivnost Na^+/K^+ pumpe utiče na aktivnost Na^+/H^+ i bikarbonatnog transportera koji učestvuju u regulaciji pH_i , kao i na aktivnost $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transportera koji učestvuje u regulaciji koncentracije Ca^{2+} u citoplazmi.



Slika 6. Pojednostavljen prikaz povezanosti Na^+/K^+ pumpe sa drugim Na^+ zavisnim transportnim sistemima. Na^+/K^+ pumpa stvara i održava gradijent Na^+ i K^+ . Koncentracija Na^+ u citoplazmi utiče na aktivnost Na^+ zavisnih transportnih sistema kao što su bikarbonatni, Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmjenjivači i transporteri šećera i amino kiselina. Modifikovano iz *Mobasheri i sar. 2000*.

Poslednjih godina, sve veći broj istraživanja pokazuje da Na^+/K^+ pumpa preko *Src* kinaze interaguje sa mnogim proteinima u ćeliji, što ističe značaj pumpe kao

signalnog molekula (*Reinhard i saradnici 2012*). Pokazano je da je Na^+/K^+ pumpa povezana sa *ERK* (kinaze regulisane ekstraćelijskim signalima) signalnim putem koji ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog metabolizma (*Sweadner 2008, Reinhard i saradnici 2012*), kao i inozitol trifosfat signalnim putem- *IP3* put, koji reguliše oslobađanje Ca^{2+} iz endoplazmatičnog retikuluma (*Yuan i saradnici 2005*).

Uloga Na^+/K^+ pumpe u regulaciji bioelektrične aktivnosti nadražljivih ćelija

Neprekidnom aktivnošću Na^+/K^+ pumpe održava se potencijal mirovanja membrane ćelija, što je neophodan uslov nadražljivosti. Narušavanje gradijenta Na^+ i K^+ jona menja bioelektričnu aktivnost neurona čime se znatno modifikuje prenošenje informacija u nervnom sistemu. Ranija istraživanja su pokazala da Na^+/K^+ pumpa reguliše potencijal mirovanja neurona puža (*Carpenter i Alving 1968, Willis i saradnici 1974, Alvarez-Leefmans i saradnici 1994*), interneurona u kičmenoj moždini pacova (*Darbon i saradnici 2003*), motoneurona u kičmenoj moždini pacova (*Ballerini i saradnici 1997*) i dopaminskih neurona u srednjem mozgu pacova (*Johnson i saradnici 1992*). Povećana aktivnost Na^+/K^+ pumpe skraćuje trajanje, tj. sužava akcioni potencijal Purkinjeovih vlakana (*Gadsby i Cranefield 1979, Gadsby 1985*). Suprotno, inhibicija Na^+/K^+ pumpe produžava trajanje, tj. dovodi do širenja akcionog potencijala u ventrikularnim miocitama morskog praseta (*Glitsch 2001*). Inhibicija Na^+/K^+ pumpe dovodi do skraćanja intervala između akcionih potencijala i smanjuje amplitudu akcionog potencijala spontano aktivnih neurona u suprahijazmatičnom jedru pacova (*Wang i Huang 2004, Wang i Huang 2006*). Isti autori pokazali su da promene u aktivnosti Na^+/K^+ pumpe učestvuju i u regulaciji cirkadijalnih promena bioelektrične aktivnosti neurona u suprahijazmatičnom jedru pacova (*Wang i Huang 2004*). Pokazano je i da Na^+/K^+ pumpa učestvuje u formiranju ćelijske memorije u neuronskoj mreži motoneurona vinske mušice (*Pulver i Griffith 2010*).

Aktivnost Na^+/K^+ pumpe je posebno važna za nervne i srčane ćelije koje poseduju spontanu bioelektričnu aktivnost. Kako takve ćelije spontano generišu akcione potencijale tokom dugih vremenskih intervala, narušeni potencijal mirovanja u intervalima između uzastopnih akcionih potencijala ponovo se uspostavlja pojačanom aktivnošću Na^+/K^+ pumpe.

MAGNETNO POLJE

Značaj istraživanja

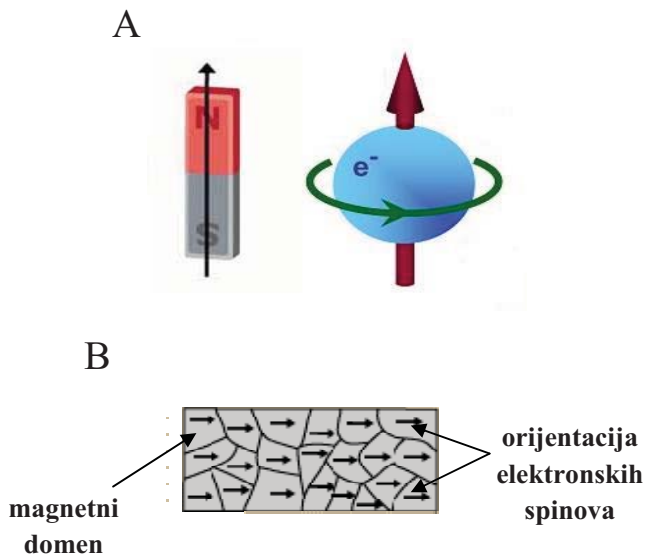
Intenzivan industrijski i tehnološki razvoj uslovio je prisustvo statičkog i promenljivog magnetnog polja različite jačine u životnoj sredini što je dovelo do povećane izloženosti organizama ovim poljima (*WHO 2006a, b*). U izveštaju Svetske zdravstvene organizacije iz 2006. godine ustanovljeni su zdravstveni kriterijumi o uticaju statičkog magnetnog polja na organizme i životnu sredinu (*WHO 2006b*). Prema ovim kriterijumima jačina magnetnog polja kojoj organizmi smeju biti akutno izloženi ima gornju granicu od 400 mT , dok pri hroničnom izlaganju ima vrednost od 40 mT . Granična vrednost je znatno niža za osobe koje nose feromagnetične implante i iznosi $0,5 \text{ mT}$. Međutim, kako su postavljeni kriterijumi zasnovani na dosadašnjim podacima iz literature o dejstvu statičkog magnetnog polja jačine veće od 2 T (*ICNIRP 2009*), može se ustanoviti da akutni i hronični efekti slabijeg statičkog magnetnog polja na organizme i životnu sredinu nisu dovoljno istraženi.

Osobine magnetnog polja

Magnetno polje stvaraju naelektrisane čestice koje se kreću, kao i spinski magnetni momenti elementarnih čestica. Promenljivo magnetno polje nastaje posredstvom naizmenečne struje usled čega se orijentacija polova ovog polja menja u pravilnim intervalima tokom vremena. Statičko magnetno polje je nepromenljivo u vremenu i može biti prirodno kakvo je magnetno polje Zemlje, kao i veštačko kakva su polja koja nastaju posredstvom jednosmerne struje ili stalnih magneta. Delovanje promenljivog magnetnog polja teško je posmatrati nezavisno od efekata njime izazvanih promena temperature i uticaja električne komponente polja, dok je uticaj statičkog magnetnog polja nezavistan od pomenutih parametara i stoga pogodniji za kontrolisane eksperimente. Kako će predmet naših istraživanja biti ispitivanje uticaja statičkog magnetnog polja koje formiraju stalni magneti, detaljnije će biti opisane samo osobine ovog polja.

Osobine statičkog magnetnog polja- stalni magneti

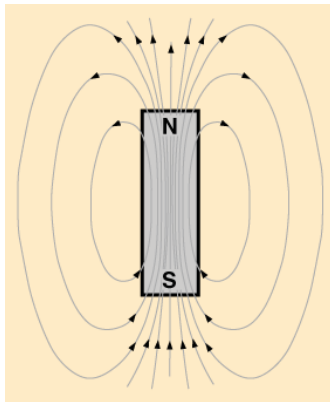
Stalni magneti imaju trajna magnetna svojstva koja su posledica strukturne organizacije njihovih atoma. Ukupni magnetni moment atoma stalnih magneta je različit od nule zahvaljujući postojanju nesparenog elektrona u poslednjoj atomskoj orbitali. U stalnim magnetima, spinovi elektrona, koji se mogu posmatrati kao mali magnetni dipoli, orijentisani su paralelno, u istom smeru i organizovani u domene (Slika 8).



Slika 8. A. Spin elektrona kao magnetni dipol. B. Paralelno orijentisani elektronski spinovi organizovani u magnetne domene (preuzeto sa <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/solids/ferro.html#c4>).

Stalni magneti razlikuju se prema sastavu hemijskih elemenata. Najjači stalni magneti u svom sastavu imaju hemijske elemente kao što su neodimijum, gvožđe i bor (*NdFeB*), ili samarijum i kobalt (*SmCo*). Slabiji magneti u svom sastavu imaju aluminijum, nikal i kobalt (*AlNiCo*). Najslabiji feritni magneti u svom sastavu imaju gvožđe i ovi magneti imaju najveću komercijalnu primenu.

Statičko magnetno polje koje stvaraju stalni magneti opisuje se pomoću linija magnetnog polja (Slika 9). Prema konvenciji, linije polja su zatvorene, izviru na pozitivnom severnom polu i uviru na negativnom juznom polu magneta. Sve linije magnetnog polja imaju istu jačinu i međusobno su paralelne. Ukupan broj linija magnetnog polja opisuje veličinu koja se naziva magnetni fluks. Magnetni fluks (Φ) se izražava u Weberima (*Wb*), pri čemu je jedan Weber jednak broju od 1×10^8 linija magnetnog polja.



Slika 9. Linije statičkog magnetnog polja koje formira stalni magnet. Linije polja izvire na severnom polu (N) i uviru na južnom polu (S) magneta, međusobno su paralelne i imaju istu jačinu. Preuzeto sa <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/magnetic/elemag.html>

Gustina linija magnetnog polja ili magnetna indukcija (B), veličina koja se najčešće koristi za opisivanje polja, definiše se kao magnetni fluks po jedinici površine normalne na pravac linija polja:

$$B = \Phi/s$$

gde je s površina u m^2 . Jedinica magnetne indukcije u SI sistemu je Tesla (T , Wb/m^2). Magnetna indukcija predstavlja jačinu magnetnog polja. Jačina magnetnog polja znatno opada sa povećanjem rastojanja od površine magneta, stoga je gradijent magnetnog polja izražen.

Magnetno polje je vektorsko polje koje je u svakoj tački okarakterisano pravcem i jačinom polja. Po definiciji, u tačkama u kojima vektor magnetnog polja ima isti intenzitet, pravac i smer magnetno polje je homogeno. S obzirom na izražen gradijent statičkog magnetnog polja, homogenost polja se može postići samo u okviru male površine.

Pregled mehanizama dejstva statičkog magnetnog polja

Prema podacima iz literature statičko magnetno polje ostvaruje dejstvo na organizme kroz mehanizme koji se zasnivaju na magnetnoj indukciji, mehaničkom dejstvu polja na orijentaciju molekula i uticaju polja na orijentaciju spina elektrona (*WHO 2006b, ICNIRP 2009*).

Mehanizam magnetne indukcije zasniva se na uticaju statičkog magnetnog polja pod dejstvom Lorencove sile na kretanje naelektrisanih čestica kao što su joni, što







dovodi do usmeravanja kretanja naelektrisanih čestica paralelno vektoru polja. Mehanički tip interakcije zasniva se na dijamagnetičnim i paramagnetičnim svojstvima atoma. Paramagnetični atomi imaju nesporen elektron i pokazuju magnetne osobine. Jezgra takvih atoma se u prisustvu spoljašnjeg magnetnog polja orijentišu paralelno i u pravcu vektora polja. Dijamagnetični atomi imaju sve elektrone sparene i ovi molekuli se orijentišu paralelno ali suprotno od pravca vektora spoljašnjeg magnetnog polja. Mehanizam dejstva na spin elektrona podrazumeva uticaj magnetnog polja na orijentaciju elektronskih spinova kratko živećih radikala koji su intermedijeri mnogih reakcija. To znači da bi se u prisustvu spoljašnjeg magnetnog polja, spin elektrona orijentisao paralelno vektoru magnetnog polja.

Statičko magnetno polje u životnoj sredini

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (*WHO 2006 b*) i Međunarodne komisije za zaštitu od nejonizujućeg zračenja (*ICNIRP 2009*) statičko magnetno polje prisutno u životnoj sredini (Slika 7) prema jačini se svrstava u slabo, umereno jako i jako (*Rosen 2003, Ghodbane i saradnici 2011*).

Slaba magnetna polja imaju jačinu manju od 1 *mT*. Svi organizmi su izloženi dejstvu slabog prirodnog statičkog magnetnog polja Zemlje jačine 30-70 μT . Brojna istraživanja usmerena su ka ispitivanju uloge ovog polja u prostornoj orijentaciji migratornih vrsta beskičmenjaka i kičmenjaka (*Johnsen i Lohman 2005, Gegear i saradnici 2010, Solov'yov i saradnici 2010, Foley i saradnici 2011, Müller i Ahmad 2011*). Veštačko slabo magnetno polje jačine $\sim 0,5$ *mT* stvaraju različiti mali stalni magneti koji imaju široku komercijalnu upotrebu u domaćinstvu. U nivou poda putničkih kabina brzih vozova izmereno je umereno jako magnetno polje jačine ~ 2 *mT*. U industriji proizvodnje i zavarivanja metala kao i elektranama, umereno jako statičko magnetno polje dostiže jačinu i do 100 *mT*. U visoko razvijenim naučno-istraživačkim centrima pojedini uređaji stvaraju umereno jako magnetno polje jačine od 600 *mT* do 1000 *mT*. Kako na ćelijama beskičmenjaka, tako i na ćelijama kičmenjaka, tokom proteklih trideset godina ispitivan je uticaj umereno jakog magnetnog polja različite jačine na morfologiju ćelija, aktivnost enzima, produkciju slobodnih radikala, strukturu i biofizičke osobine membrane, unutarćelijsku koncentraciju Ca^{2+} i gensku ekspesiju. Izvestan deo istraživanja odnosi se na mogućnost terapijske primene umereno jakog

magnetnog polja, naročito u ublažavanju bola u osteoartritisu (*Harlow i saradnici 2004, Wolsko i saradnici 2004*). Jako magnetno polje jačine veće od 1 T nalazi široku primenu u medicinskoj dijagnostici, stoga se posebno ispituje njegovo moguće štetno dejstvo na zdravlje čoveka. Najviše je ispitivan uticaj jakog statičkog magnetnog polja na strukturu membrane. Pokazano je da ovo polje utiče na orijentaciju fosfolipida organizovanih u loptaste strukture- micle i bicele (*Picard i saradnici 1999, Arnold i saradnici 2002, Whiles i saradnici 2002, Warschawski i saradnici 2011*).

Statičko magnetno polje					
slabo <1mT		umereno jako 1mT-1T			jako 1T-5T
					
30-70 μ T	~0,5mT	~2mT	5-100mT	600-1000mT	~3T

Slika 7. Slabo, umereno jako i jako statičko magnetno polje. Prirodno magnetno polje Zemlje, veštačka statička magnetna polja u životnoj sredini i njihove jačine.

Uprkos raznovrsnim i brojnim istraživanjima, do danas nije precizno određen prag jačine magnetnog polja koji dovodi do promena u ćeliji, zavisnost veličine izazvane promene od jačine magnetnog polja, kao ni mehanizmi dejstva magnetnog polja. Jednim od osnovnih uzroka ovih problema smatra se nedovoljno precizno dizajniranje eksperimentalnih uslova izlaganja magnetnom polju što dovodi do teškoća u reprodukcovanju eksperimentalnih rezultata u različitim laboratorijama. Stoga su neophodna dodatna istraživanja koja bi potpunije okarakterisala dejstvo magnetnog polja u precizno definisanim eksperimentalnim uslovima.

Uticaj umereno jakog statičkog magnetnog polja na nervni sistem

Pošto nervni sistem ima centralnu ulogu u regulaciji opšte aktivnosti organizma, veliki deo istraživanja bio je usmeren ka ispitivanju promena bioelektričnih osobina neurona pod uticajem umereno jakog statičkog magnetnog polja. Kako bioelektrične osobine membrane određuju fiziološko stanje neurona, važno je ustanoviti do kojih promena na membrani dolazi pod uticajem magnetnog polja.

Uticaj na nervni sistem beskičmenjaka

Ispitivanje uticaja statičkih magnetnih polja na nervni sistem beskičmenjaka najčešće se vrši na ćelijskog nivou tj. na pojedinačnim neuronima u *in situ* uslovima u izolovanom nervnom sistemu.

Istraživanja na neuronima puža *Helix lucorum* pokazala su da kratkotrajno izlaganje statičkom magnetnom polju jačine 23, 120 i 200 *mT* u trajanju od 20 *min* različito utiče na bioelektričnu aktivnost nemih i spontano aktivnih neurona (*Balaban i saradnici 1990*). Naime, magnetno polje izaziva smanjenje otpora membrane nemih neurona i povećanje otpora membrane spontano aktivnih neurona. Veličina promene ispitivanog parametra srazmerna je jačini magnetnog polja.

U drugoj studiji, istraživanja na spontano aktivnim neuronima puža *Helix aspersa* (*Azanza i del Moral 1994*) pokazala su da statičko magnetno polje jačine 115 *mT* i 260 *mT* menja spontanu bioelektričnu aktivnost neurona u visceralnoj i parijetalnim ganglijama. Uticaj magnetnog polja je okarakterisan kao inhibitoran, jer je izlaganje polju izazvalo hiperpolarizaciju membrane i smanjenje frekvencije akcionih potencijala ispitivanih spontano aktivnih neurona. Uočeno je da je efekat magnetnog polja inhibitoran kod svih ispitivanih neurona kod kojih je efekat *kafeina*, jedinjenja koje mobilise Ca^{2+} iz intracelularnih depoa, takođe inhibitoran.

Ispitivanje uticaja statičkog magnetnog polja vršeno je i na lateralnom džinovskom (*LG*) neuronu rečnog raka *Procambarus clarkii* (*Ye i saradnici 2004*). Uočeno je da izlaganje magnetnom polju od 8,04 *mT* u trajanju od 5 *min* dovodi do povećanja amplitude akcionog potencijala. Isti autori su pokazali da magnetno polje povećava otpor membrane i pojačava ekscitatorne postsinaptičke potencijale ispitivanog neurona. Kako se promene merenih bioelektričnih parametara izazvane magnetnim poljem nisu mogle uočiti nakon primene *rutenijum red* blokatora, pretpostavljeno je da značajnu ulogu u uočenim promenama ima povećanje unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} .

Ispitivanja uticaja statičkog magnetnog polja vršeno je i na neuronima u antenalnom režnju strižibube *Morimus funereus* (*Todorović i saradnici 2007*). Uočeno je da se odgovor grupe neurona menja nakon izlaganja magnetnom polju jačine 2 *mT* u trajanju od 5 *min*. Magnetno polje je izazvalo i povećanja i smanjenje frekvencije vanćelijski registrovanih akcionih potencijala. Uočene promene su bile nepovratne i mogle su se uočiti i 5 *min* nakon izlaganja neurona magnetnom polju.

Utica j na nervni sistem kičmenjaka

Utica j statičkog magnetnog polja na nervni sistem kičmenjaka uglavnom se izučava na disociranim neuronima, kulturama ćelija nervnog sistema kao i na moždanim presecima.

Istraživanja na disociranim neuronima pokazala su da pri izlaganju magnetnom polju od 125 *mT* u trajanju od 15 *min* dolazi do inaktivacije voltažno zavisnih K⁺ kanala neurona u korenu trigeminalne ganglije pacova (*Jie-Fei i saradnici 2007*). Izlaganje magnetnom polju od 123 *mT* u trajanju od 150 *s* inaktivira i voltažno zavisne Ca²⁺ kanale u liniji *GH3* ćelija (*Rosen 1996*). Izlaganje magnetnom polju iste jačine u trajanju od 75 *s* smanjuje frekvenciju akcionih potencijala neurona u lateralnom genikulatnom telu mačke (*Rosen i Lubowsky 1990*). Smanjenje frekvencije akcionih potencijala uočeno je i kod disociranih neurona u dorzalnom korenu ganglije miša pri izlaganju magnetnom polju od 10 *mT* u trajanju od 200-250 *s* (*McLean i saradnici 1995*). Smanjenje amplitude akcionog potencijala u korteksu mozga mačke (*Rosen i Lubowsky 1990*) uočeno je 50-95 *s* od početka izlaganja magnetnom polju jačine 120 *mT* (*Rosen i Lubowsky 1987*).

Istraživanja na moždanim presecima pokazala su da izlaganje magnetnom polju jačine 2-3 *mT* u trajanju od 20 *min* smanjuje električni odgovor grupe neurona u hipokampalnim presecima miša (*Wieraszko 2000*). Dejstvo magnetnog polja nije se moglo uočiti nakon primene *dantrolena*, blokatora Ca²⁺ kanala na endoplazmatičnom retikulumu, te je stoga pretpostavljeno da bi ovi kanali mogli imati značajnu ulogu u uočenim promenama izazvanim magnetnim poljem.

Studija na pacijentima obolelim od epilepsije pokazala je da izlaganje statičkom magnetnom polju jačine 0,9 *mT* i 1,8 *mT* u trajanju od 20 *s* izaziva epileptična električna pražnjenja u hipokampusu. Ovi rezultati ukazali su na moguću terapeutsku primenu magnetnog polja u preciznijoj lokalizaciji regiona u mozgu koji su pogođeni epileptičnim napadima (*Fuller i saradnici 1995*).

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovih istraživanja je da se okarakterišu promene bioelektrične aktivnosti identifikovanih Br i N1 neurona vinogradskog puža *Helix pomatia* L, kao i da se ispituju uzroci nastalih promena pri kratkotrajnom izlaganju neurona umereno jakim statičkom magnetnom polju jačine 2,7 i 10 *mT* u trajanju od 15 *min*.

Iz opisanog cilja proizašli su sledeći zadaci rada:

1. Utvrditi koji se parametri bioelektrične aktivnosti spontano aktivnog Br i nemog N1 neurona menjaju pri kratkotrajnom izlaganju neurona magnetnom polju jačine 2,7 i 10 *mT*. Na taj način će se doći do podataka o tome da li je delovanje magnetnog polja specifično za određen tip bioelektrične aktivnosti neurona u nervnom sistemu puža. Međusobnim poređenjem utvrdiće se zavisnost promena bioelektričnih parametara neurona od jačine magnetnog polja. Analiziranje bioelektričnih parametara u periodu od 20 *min* po završetku izlaganja neurona polju pružiće podatke o produženom delovanju magnetnog polja na bioelektričnu aktivnost neurona.

2. Ispitati aktivnost Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža pri kratkotrajnom delovanju magnetnog polja od 10 *mT* radi otkrivanja mehanizama dejstva magnetnog polja na bioelektričnu aktivnost neurona. Kontrolisanjem eksperimentalnih uslova blokiraće se i stimulisaće se procesi fosforilacije i defosforilacije koji su uključeni u regulaciju aktivnosti Na^+/K^+ pumpe. Poređenje aktivnosti Na^+/K^+ pumpe u kontrolnim uslovima i u uslovima izlaganja magnetnom polju pružiće podatke o uključenosti procesa fosforilacije i defosforilacije u puteve delovanja magnetnog polja na bioelektričnu aktivnost neurona.

3. Ispitati uticaj magnetnog polja od 10 *mT* na sadržaj organofosfatnih jedinjenja u okoloždrelnim ganglijskim kompleksima da bi se sagledao energetska status nervnog sistema puža nakon izlaganja magnetnom polju, s obzirom na činjenicu da je Na^+/K^+ pumpa izrazit potrošač *ATP*-a. Ispitivanje uticaja magnetnog polja od 10 *mT* na unutarćelijski pH u nervnom sistemu puža pokazaće da li je aktivnost Na^+/H^+ izmenjivača, pH regulatornog mehanizma čija je aktivnost zavisna od aktivnosti Na^+/K^+ pumpe, promenjena nakon izlaganja magnetnog polju.

4. Istražiti uticaj magnetnog polja od 10 mT na parametre bioelektrične aktivnosti spontano aktivnog Br neurona u uslovima kada je Na^+/K^+ pumpa blokirana ouabainom, da bi se utvrdilo da li do njihove promene dolazi usled promena u aktivnosti pumpe. Istovremeno, detaljna analiza parametara bioelektrične aktivnosti Br neurona bi trebalo da na potpuniji način opiše ulogu Na^+/K^+ pumpe u regulaciji bimodalnog ritma ovog neurona.

Dobijeni rezultati bi trebalo da pruže nove podatke o dejstvu statičkog magnetnog polja na bioelektričnu aktivnost neurona i da razjasne kakvu ulogu ima Na^+/K^+ pumpa u uočenim promenama bioelektričnih parametara neurona u magnetnom polju.

MATERIJAL I METODE

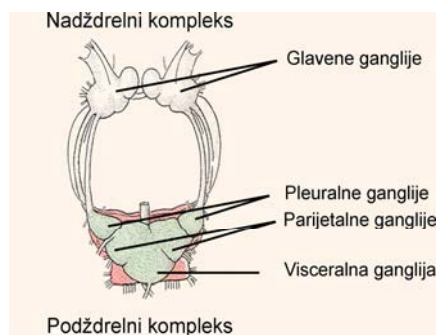
EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Kao eksperimentalne životinje korišćeni su vinogradski puževi vrste *Helix pomatia* (filum *Mollusca*, klasa *Gastropoda*). Svi eksperimenti izvedeni su na nervnom sistemu puža tj. na izolovanom okoždrelnom ganglijskom kompleksu (Slika 10A). Okoloždrelni ganglijski kompleks sačinjen je od nadždrelnog i podždrelnog kompleksa ganglija koji su povezani konektivima. Nadždrelni kompleks se sastoji od dve glavene ganglije, dok u sastav podždrelnog kompleksa ulaze parne pedalne, parijetalne i pleuralne ganglije, kao i neparna visceralna ganglija (Slika 10B).

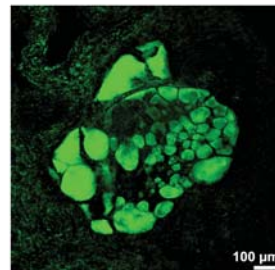
A



B



C



Slika 10. A. Vinogradski puž i izolovani okoždrelni ganglijski kompleks. B. Šematski prikaz nadždrelnog i podždrelnog ganglijskog kompleksa i ganglija koje ulaze u njihov sastav. C. Presek podždrelnog kompleksa, neuroni su obojeni *NeuroTrace* bojom (koncentracija 1:100).

Neuroni puža su velikih dimenzija, imaju stalan položaj u ganglijama i ostvaruju stalne sinaptičke veze sa drugim neuronima što eksperimente čini reproducibilnim (Slika 10C). Izolovani okoždrelni ganglijski kompleks puža može se održavati u *in vitro* uslovima u toku dužeg vremenskog perioda, čak i do nekoliko dana. Puževi su sakupljeni iz prirodne sredine, uvek sa istih lokaliteta na području Beograda i okolini

Pančeva u toku proleća (april i maj) i u jesen (septembar i oktobar). Prikupljeni puževi su čuvani u plastičnim kavezima u stanju dormancije, u hladnoj komori na temperaturi od 7 °C. Dve nedelje pre početka eksperimenata, puževi su čuvani na sobnoj temperaturi, kvašeni vodom, hranjeni listom maslačka ili zelenom salatam i na taj način održavani u aktivnom stanju. Za eksperimente su korišćene odrasle životinje.

PRIPREMA EKSPERIMENTALNOG OBJEKTA

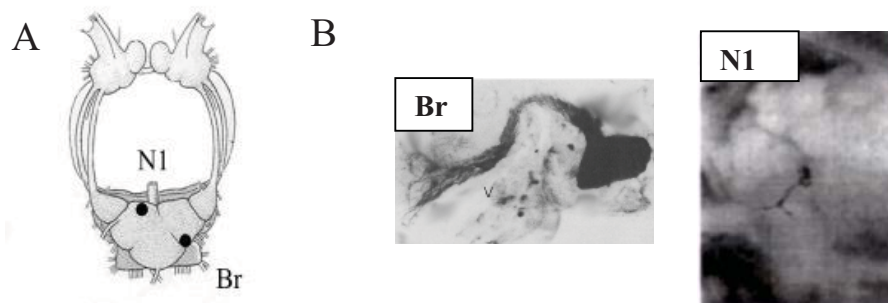
Izolovanje okoloždrelnog ganglijskog kompleksa za biohemijske i NMR eksperimente

Neposredno pre eksperimenata, odabrani puževi su kvašeni toplom vodom što je dovelo do izvlačenja glave i stopala iz kućice životinje. Životinje su žrtvovane odsecanjem stopala koje je potom fiksirano čiodama za pločicu od plute. Medijalni presek na dorzalnoj strani fiksiranog stopala u glavenom regionu omogućio je pristup okoloždrelnom ganglijskom kompleksu. Pod binokularnim mikroskopom (*Bausch & Lomb*) presecani su svi nervi koji polaze sa ganglija, okoloždrelni kompleks ganglija je odvajan od stopala životinje i smeštan u plastičnu komoricu ispunjenu fiziološkim rastvorom za puža. Ovako izolovan okoloždrelni ganglijski kompleks korišćen je za biohemijske i *NMR* eksperimente.

Preparovanje podždrelnog ganglijskog kompleksa za elektrofiziološke eksperimente

Za ispitivanja bioelektričnih osobina identifikovanih neurona, izolovan okoloždrelni ganglijski kompleks smeštan je u komoricu za registrovanje zapremine 1 ml koja je ispunjena fiziološkim rastvorom. Dno komorice prekriveno je providnim elastičnim materijalom - silgardom, koji je otporan na hemijske, električne i toplotne promene (*Sylgard 184 Encapsulating Resin, Electronic materials Department Dow Corning Corporation, Midland, Michigan, USA*). Pomoću finih čiodica izolovani okoloždrelni kompleks fiksiran je za dno komorice dorzalnom stranom na gore. Neuroni u ganglijama prekriveni su višeslojnim ovojnicaama koje se moraju precizno ukloniti jer predstavljaju mehaničke teškoće za implantaciju elektrode u neuron. Debljina i tvrdoća ovojnice variraju kod jedinki različite starosti, a i zavisno od doba godine, s obzirom da ova životinjska vrsta ima sezonske ritmove. Stoga je potrebno birati puževe približno

iste starosti (prečnik kućice približno 4 cm) i izvoditi eksperimente na životinjama koje se u laboratorijskim uslovima pre početka eksperimenta održavaju u aktivnom stanju određeni period vremena (približno 14 dana). Spoljašnja ovojnica je meka i uklanja se relativno lako upotrebom pinceta i oftalmoloških makazica (*Scissors Spring Vannas Dissect, World Precision Instruments, Sarasota, FL*). Unutrašnja ovojnica koja direktno naleže na neurone staklasta je i čvrsta i uklanja se upotrebom finijih pinceta. Kako su ovojnice slabo prozirne, prilikom preparovanja vršeno je direktno osvetljavanje izolovanog okoloždrelnog ganglijskog kompleksa snopom svetlosti fokusiranim u tačku prečnika približno 1 mm. Za elektrofiziološke eksperimente odabrani su Br i N1 neuroni koji se nalaze u podždrelnom kompleksu ganglija (Slika 11).



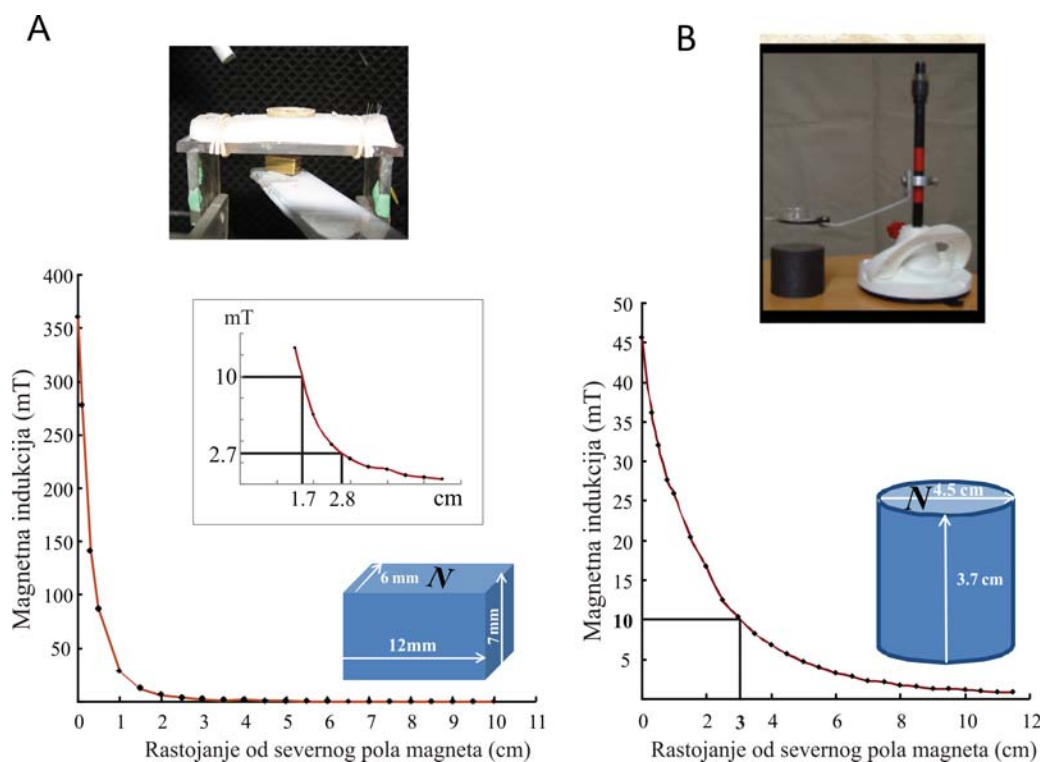
Slika 11. A. Šematski prikaz položaja ispitivanih N1 i Br neurona u podždrelnom ganglijskom kompleksu puža. B. Br neuron obojen peroksidazom rena. Akson se pruža u visceralnu gangliju (V), uveličanje x350 (preuzeto iz *Elekes i sar. 1983*). N1 neuron obojen CoCl_2 , prečnik ćelijskog tela neurona je $333,9 \pm 11,2$ μm . Ogranci aksona pružaju se ka levom palealnom nervu i desnoj parijetalnoj gangliji (preuzeto od *Kartelija 1992*).

U gornjem desnom kvadrantu leve parijetalne ganglije nalazi se nemi N_1 neuron, dok je u donjem levom kvadrantu desne parijetalne ganglije smešten beličasti Br neuron koji se odlikuje spontanom bioelektričnom aktivnošću. Morfološke, bioelektrične i farmakološke osobina oba neurona u velikoj meri su već opisane (*Vadasz i Salanki 1976, Carpenter 1978, Salanki 1979, Kartelija i Pašić 1982, Kononenko 2000*).

EKSPERIMENTALNA POSTAVKA ZA IZLAGANJE MAGNETNOM POLJU

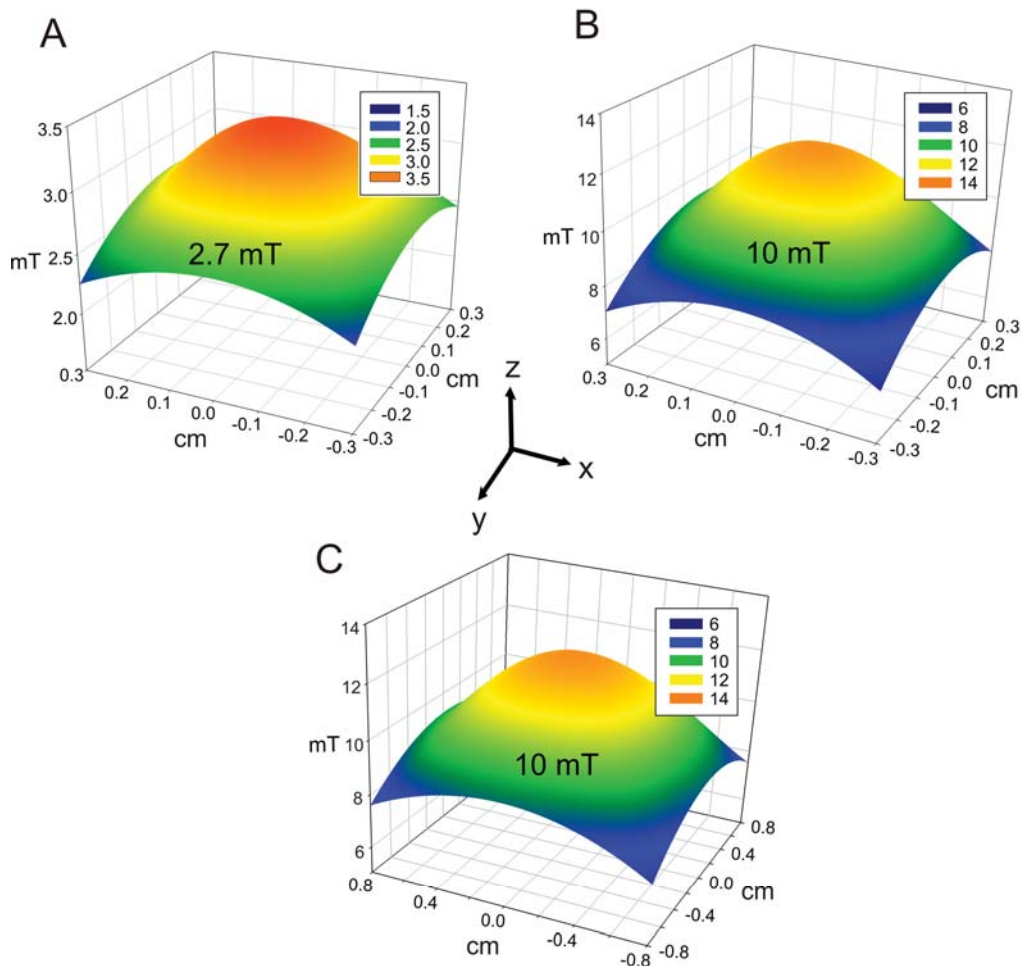
U eksperimentima su korišćeni feritni magneti oblika kvadra dimenzija 12 mm x 6 mm x 7 mm i oblika valjka prečnika 4,5 cm i visine 3,7 cm koji su stvarali umereno jako statičko magnetno polje. Jačina magnetnog polja merena je pomoću *GMO5* gausmetra sa *PT2837* sondom (*Hirst, Magnetic Instruments Ltd, Cornwall, UK*). Sa

Slike 12 može se videti da je gradijent polja izražen i da jačina magnetnog polja znatno opada sa povećanjem rastojanja od severnog pola magneta.



Slika 12. A. Fotografija sistema za izlaganje magnetnom polju i izmereni gradijent polja u elektrofiziološkim eksperimentima. Uveličani deo prikazuje jačinu magnetnog polja (2,7 mT i 10 mT) na rastojanju 1,7 cm i 2,8 cm od severnog pola magneta (N). B. Fotografija sistema za izlaganje magnetnom polju i izmereni gradijent polja u biohemijskim esejima i NMR eksperimentima. Na rastojanju 3 cm od severnog pola magneta jačina magnetnog polja je 10 mT.

Na rastojanjima 2,8 cm i 1,7 cm od severnog pola magneta izmerene su jačine magnetnog polja od 2,7 mT i 10 mT, čiji su efekti na bioelektrične osobine Br i N1 neurona ispitivani u elektrofiziološkim eksperimentima (Slika 12A). Na rastojanju 3 cm od severnog pola valjkastog magneta izmerena je jačina magnetnog polja od 10 mT, čiji su efekti na izolovani okoloždrelni ganglijski kompleks ispitivani u biohemijskim i u NMR eksperimentima (Slika 12B). Na utvrđenim rastojanjima magnet je postavljan na plastični držač laboratorijske izrade i smeštan ispod dna plastične komorice ispunjene fiziološkim rastvorom za puža u kojoj se nalazi izolovan okoloždrelni ganglijski kompleks. Jačina magnetnog polja precizno je kontrolisana gausmetrom, tako da je tokom eksperimenata izolovani okoloždrelni ganglijski kompleks uvek bio izložen polju jačine 2,7 mT ili 10 mT. Distribucija linija statičkog magnetnog polja u eksperimentalnoj postavci prikazana je na Slici 13.



Slika 13. Distribucija linija magnetnog polja merena po x,y i z osi u eksperimentalnoj postavci. Centar plastične komorice predstavlja nultu tačku u merenjima. Označene su ispitivane jačine magnetnog polja od 2,7 mT (A) i 10 mT (B) za magnet oblika kvadra i jačina od 10 mT za valjkasti magnet (C).

Distribucija linija magnetnog polja merena je gausmetrom postavljenom na manipulator iznad magneta na utvrđenim rastojanjima (Slika 13). Pomeranjem manipulatora za po 1 mm, jačina polja merena je po x, y i z osi. Na osnovu izmerenih vrednosti, u programu SigmaPlot, napravljen je trodimenzionalni prikaz distribucija linija polja. U nivou površine okoždrelnog ganglijskog kompleksa homogenost magnetnog polja je bila visoka. Jačine polja i njihove standardne devijacije imale su vrednosti: $2,701 \pm 0,05$ mT i $10,01 \pm 0,21$ mT za magnet oblika kvadra, i $10,07 \pm 0,18$ mT za valjkasti magnet. Tokom čitavog perioda izlaganja magnetnom polju nije dolazilo do promena temperature fiziološkog rastvora (*DVM 401 Environment Meter, Velleman, USA*). U eksperimentalnim uslovima koji su korišćeni pri elektrofiziološkim merenjima

izvršena su kontrolna merenja temperature u vremenskim intervalima od po 1 *min* sa i bez magneta, koja su pokazala da je vrednost temperature fiziološkog rastvora u komorici za registrovanje bez magneta bila $23,64 \pm 0,21$ °C, a u prisustvu magneta $23,74 \pm 0,13$ °C. Tokom eksperimenata jačina lokalnog geomagnetnog polja (44°38' severno, 20°46' istočno) bila je u okviru prosečnih vrednosti izmerenih *GSM 10* magnetometrom u Geomagnetnoj opservatoriji (*Beograd, Grocka*).

U svim eksperimentima izolovani okoloždrelni ganglijski kompleksi akutno su izlagani magnetnom polju u trajanju od 15 *min*.

ELEKTROFIZIOLOŠKI EKSPERIMENTI

Sastav rastvora

Svi rastvori korišćeni u elektrofiziološkim eksperimentima proticali su kroz komoricu za registrovanje sistemom perfuzije pod dejstvom gravitacije. Fiziološki rastvor za vinogradskog puža prilagođen je sastavu i pH vrednosti ekstracelularne tečnosti puža (*Kerkut 1975, Burton 1971, Barker i Gainer 1975, Meincke 1975*) i sastoji se od: 80 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 4 mM KCl, 5 mM TRIS-Cl. Tris-Cl služi kao pufer kojim se pH podesi na vrednost 7.8

U eksperimentima u kojima je ispitivan uticaj 8-bromoguanozin 3',5'-cikličnog monofosfata (*8-Br-cGMP*) i ouabaina, supstance su rastvarane u fiziološkom rastvoru u koncentraciji 10^{-4} M neposredno pre izvođenja eksperimenata (*Ayrapetyan 1976, Kartelija 2003*).

Sva jedinjenja za pravljenje rastvora korišćenih u elektrofiziološkim merenjima su od proizvođača *Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany)*.

Intracelularna registracija bioelektrične aktivnosti Br i N1 neurona

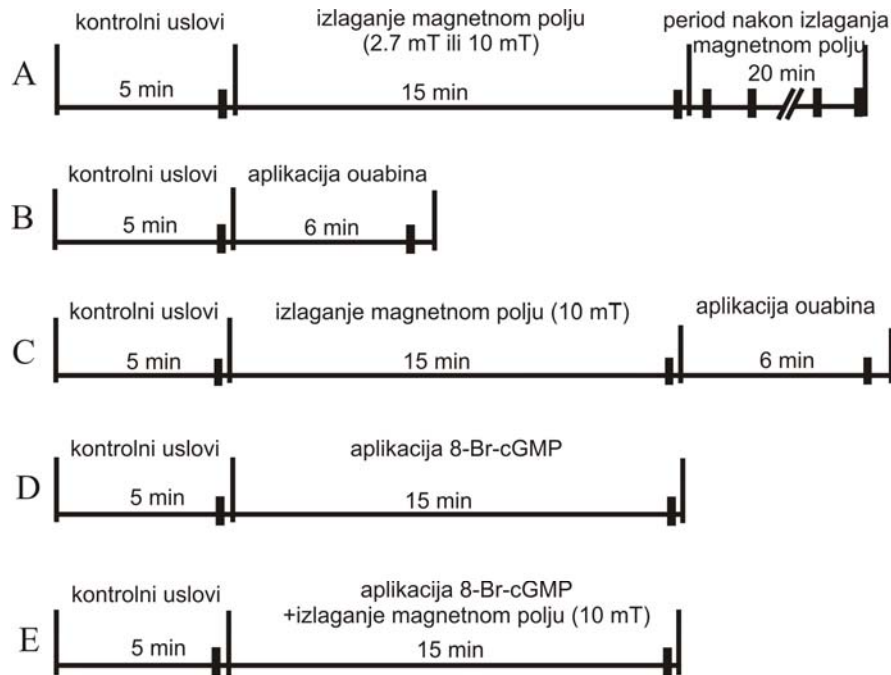
Standardna tehnika za intracelularno registrovanje potencijala membrane korišćena je u eksperimentima u kojima su mereni bioelektrični signali iz tela Br i N1 neurona. Bioelektrični signali neurona mereni su pomoću pojačavača *SEC-2 M (Jozsef Atilla University, Szeged, Hungary)*. Podaci su prikupljeni na frekvenciji semplovanja od 1 kHz, dok je A/D konverzija vršena 16 bitnim konvertorom (*MiniDigi 1A, Axon Instruments*). Bioelektrični signali su kontinualno zapisivani na PC računaru pomoću

Axoscope programa (*Axon instruments*). Signali iz tela neurona su automatski linearno interpolirani pomoću algoritma u *Axoscope* programu, pri čemu je zadržana frekvencija semplovanja od 1 kHz. Stimulacija N1 neurona pravougaonim stimulusima vršena je pomoću stimulatora (*Command generator, Jozsef Atilla University, Szeged, Hungary*). Merenje otpora elektrode za registrovanje vršeno je na predpojačavaču *SEC-2 M* prethodno kalibrisanom pomoću model ćelije poznatog otpora od 10 MΩ (*Model circuit MC-9, HEKA Elektronik, GmbH, Germany*).

Mikropipete za intracelularno registrovanje izvlačene su od borosilikatnog stakla sa filamentom (*1B120F-4 WPI, Sarasota FL*) na vertikalnom izvlakaču u jednom koraku (*Model 700C, David Kopf Inst., Tujunga CA*). Mikropipete su punjene (2/3 zapremine) rastvorom 1M *K-citrata* i imale su otpor od 15 do 18 MΩ. Referentnu elektrodu je predstavljala *Ag/AgCl* žica uronjena u rastvor 1M *KCl*. Referentna elektroda je bila povezana sa komoricom za registrovanje agarskim mostom. Agarski most se pravi od staklenih cevčica koje se pune 0,1 % rastvorom agara (*Torlak, Srbija*) skuvanom u fiziološkom rastvoru za puža.

Nakon ubadanja neurona mikropipetom neophodno je sačekati približno 30 min dok bioelektrična aktivnost neurona ne dostigne stabilnost za period bar od 5 min. Posle toga registrovana je bioelektrična aktivnost Br i N1 neurona u različitim eksperimentalnim protokolima. Registrovana je aktivnost neurona u kontrolnim uslovima (bez izlaganja magnetnom polju) u trajanju od 5 min, tokom izlaganja statičkom magnetnom polju jačine 2,7 mT ili 10 mT u trajanju od 15 min, kao i nakon izlaganja magnetnom polju u trajanju od 20 min (Slika 14A). Analizirani su podaci dobijeni tokom intervala od 60 s u kontrolnim uslovima (od 4. do 5. min), u uslovima izlaganja magnetnom polju (od 14. do 15. min) kao i nakon izlaganja magnetnom polju (4-5, 9-10, 14-15 i 19-20. min). Ouabain je dodavan nakon kontrolnog perioda, odnosno nakon perioda izlaganja magnetnom polju jačine 10 mT (Slika 14 B i C). Ouabain je uveden u komoricu perfuzijom u trajanju od 6 min. Analizirani su podaci dobijeni izdvajanjem 10 i 20 uzastopnih paketića i odgovarajućih intervala između paketića akcionih potencijala Br neurona u 5. min kontrolnih uslova, 15. min izlaganja magnetnom polju i 4. min nakon dodavanja ouabaina. *8-Br-cGMP* uveden je u komoricu perfuzijom u trajanju od 15 min, kako bez prisustva magnetnog polja, tako i tokom celog perioda izlaganja magnetnom polju od 10 mT (Slika 14 D i E). Analizirani

su podaci dobijeni izdvajanjem 10 uzastopnih paketića i odgovarajućih intervala između paketića akcionih potencijala Br neurona u 5. min kontrolnih uslova, 15. min od početka dodavanja 8-Br-cGMP-a i 15. min od početka istovremene aplikacije 8-Br-cGMP-a i izlaganja magnetnom polju.



Slika 14. Eksperimentalni protokoli za ispitivanje uticaja magnetnog polja na bioelektrične osobine Br i N1 neurona (A-E); crne uspravne deblje oznake označavaju periode u kojima je analizirana bioelektrična aktivnost neurona: 5. min u kontrolnim uslovima, 15. min izlaganja magnetnom polju, 5, 10, 15, 20. min nakon izlaganja magnetnom polju, 4. min aplikacije ouabaina i 15. min aplikacije 8-Br-cGMPa.

Uzeti su za analizu samo neuroni koji su ostajali vijabilni 30 min nakon izlaganja magnetnom polju, tretiranja ouabainom ili 8-Br-cGMP-om.

Analiza elektrofizioloških signala

Analizirani su sledeći parametri bioelektrične aktivnosti Br i N1 neurona:

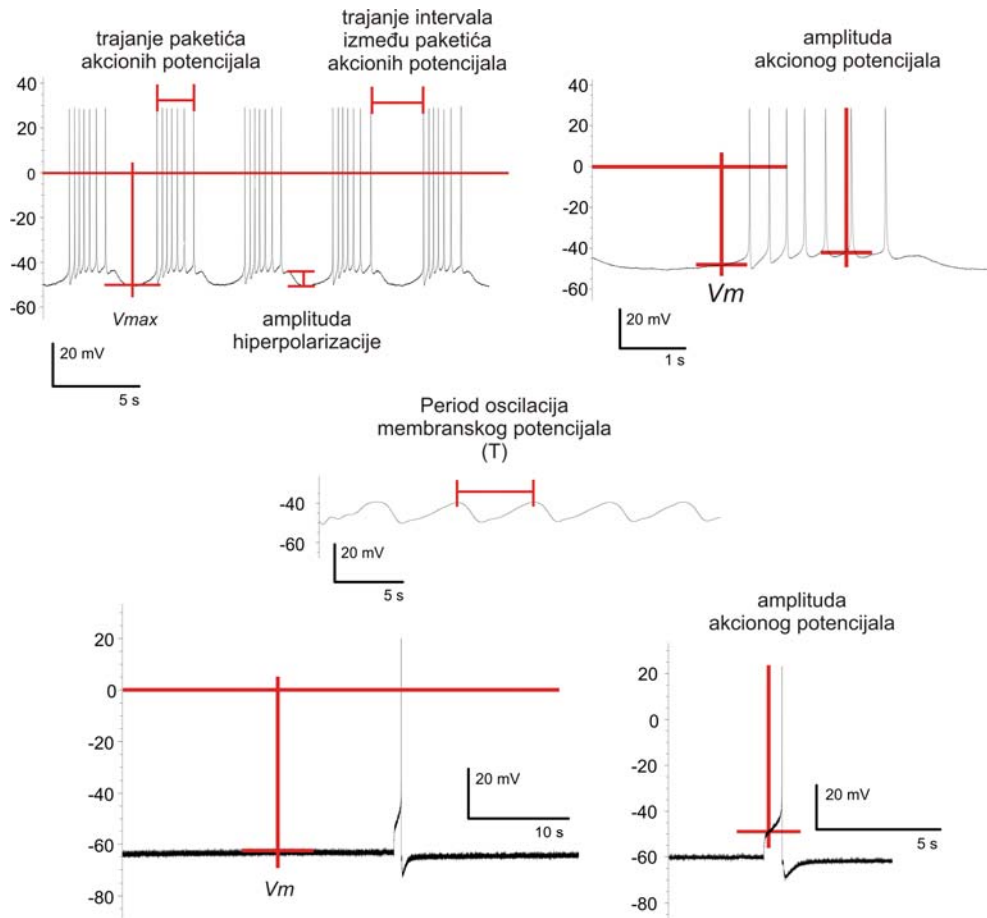
- 1) Potencijal mirovanja membrane (V_m)- meren u zaravnjenom depolarišućem delu intervala između paketića akcionih potencijala za Br neuron, odnosno neposredno pre nastanka akcionog potencijala za N1 neuron za period od 1 min (Slika 15);
- 2) Amplituda akcionog potencijala - merena od trenutka nastajanja uzlazne faze do vrha akcionog potencijala za period od 1 min (Slika 15);

- 3) Trajanje akcionog potencijala – računato na polovini amplitude akcionog potencijala kreiranjem modela koji je najbolje odgovarao podacima odabranim za analizu za period od 1 *min*;

Samo na Br neuronu ispitani su sledeći parametri bioelektrične aktivnosti:

- 1) Frekvencija akcionih potencijala - merena kao broj akcionih potencijala u minuti za period od 5 *min* ili kao broj akcionih potencijala u 10 paketića;
- 2) Maksimalna vrednost potencijala mirovanja membrane (V_{max}) - merena kao najnegativnija vrednost potencijala mirovanja membrane za 20 uzastopnih paketića akcionih potencijala (*Vadasz i saradnici 1976*, Slika 15);
- 3) Trajanje paketića akcionih potencijala - mereno od prvog do poslednjeg akcionog potencijala u paketiću (*Benson i saradnici 1987*) za 10 uzastopnih paketića (Slika 15);
- 4) Trajanje intervala između paketića akcionih potencijala - mereno od poslednjeg akcionog potencijala u paketiću do prvog akcionog potencijala u narednom paketiću (*Benson i saradnici 1987*) za 10 uzastopnih intervala (Slika 15);
- 5) Amplituda hiperpolarizacije – merena od vrha depolarizacione promene na kraju paketića koja ne dovodi do stvaranja akcionog potencijala do najnegativnijeg dela potencijala mirovanja membrane (*Junge and Stephens 1973*) za 10 uzastopnih paketića (Slika 15);
- 6) Trajanje prva tri akciona potencijala u 10 uzastopnih paketića mereno je na polovini amplitude akcionog potencijala kreiranjem modela koji je najbolje odgovarao podacima odabranim za analizu;
- 7) Trajanje prva tri intervala između akcionih potencijala u paketiću (*ISI*) – računato je između silazne faze akcionog potencijala i uzlazne faze sledećeg akcionog potencijala u paketiću kreiranjem modela koji je najbolje odgovarao podacima odabranim za analizu u 10 uzastopnih paketića;

- 8) Period oscilacija – T , meren je kao trajanje između dva susedna maksimuma amplitude oscilacija za 10 paketića akcionih potencijala. Oscilacije membranskog potencijala izdvojene su filtriranjem signala *Butterworth* filterom u *Clampfit* programu (Slika 15).



Slika 15. Merenje parametara bioelektrične aktivnosti Br (A) i N1 neurona (B) u *Clampfit* programu.

Signali su mereni sa preciznošću većom od 1 ms uprkos ograničenju samog uređaja za *A/D* konverziju zbog čega nije bilo moguće postići frekvenciju smplovanja veću od 1kHz. *Fourier*-ove analiza prva tri akciona potencijala iz deset uzastopnih paketića pokazala je da frekventni spektar akcionih potencijala ima značajne vrednosti amplitude samo u opsegu frekvencija od 0-300 Hz. To je značilo da je frekvencija smplovanja u našim eksperimentima bila dovoljna za pravilnu reprodukciju signala iz ćelijskih tela neurona, jer prema *Nyquist*-ovoj teoremi frekvencija smplovanja (f_s) mora biti dvostruko veća od najviše frekvencije koja karakteriše neki signal (f_c), $f_s \geq 2f_c$.

Takođe, linearna interpolacija signala omogućila je merenje trajanja akcionih potencijala sa preciznošću većom od 1 ms jer značajne vrednosti amplituda akcionih potencijala nisu postojale iznad frekvencije od 300 Hz.

BIOHEMIJSKI EKSPERIMENTI

Uticaj magnetnog polja jačine 10 mT na aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe u izolovanom okoloždrelnom ganglijskom kompleksu ispitivan je biohemijskim metodama. Okoloždrelni ganglijski kompleksi izlagani su magnetnom polju u trajanju od 15 min, dok su kontrolni okoloždrelni ganglijski kompleksi bili u istim eksperimentalnim uslovima ali bez prisustva magnetnog polja.

Priprema uzoraka za biohemijsku analizu

Kontrolni i okoloždrelni ganglijski kompleksi izlagani magnetnom polju jačine 10 mT, najpre su smrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80 °C do početka eksperimenata. Neposredno pre eksperimenata uzorci su mehanički homogenizovani u 0,7 mL 50 mM Tris-HCl puferu čiji je pH 7,4 i 0,01% Triton X-100 deterdžentu koji permeabilizuje membrane ćelija. Ovako pripremljeni homogenati su centrifugirani 3 min na 4000 obrtaja (*Eppendorf microcentrifuge model 5415R*). Za određivanje ATP-azne aktivnosti Na⁺/K⁺ pumpe korišćen je supernatant. Prilikom pripreme tkiva, kao i tokom svih biohemijskih analiza uzorci su čuvani na ledu da bi se redukovala razgradnja ATP-a.

Određivanje aktivnosti Na⁺/K⁺ pumpe

Aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe praćena je po metodi Ramnaman i Storey (2006), modifikovanoj za čitač mikrotitar pločica (*DV 990B/V6, GDV, Italy*). Aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe merena je kao razlika u produkciji fosfata između reakcione smeše bez dodatog ouabaina (20 mM KCl, 100 mM NaCl) i reakcione smeše sa dodatim ouabainom (4.7 mM ouabain, 120 mM NaCl, bez KCl). Obe reakcione smeše sadržale su 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP-Mg i 25 mM TRIS (pH 7,4) u finalnoj zapremini od 200 μL.

Ispitivanje uticaja procesa fosforilacije i defosforilacije na aktivnost Na^+/K^+ pumpe

Uticaj procesa fosforilacije i defosforilacije na aktivnost pumpe ispitan je prema protokolu opisanom u *Ramnanan* i *Storey (2006)* modifikovanom za čitač mikrotitarskih pločica. Da bi se ispitao efekat permeabilnih homologa 8-bromoadenozin 3',5'-cikličnog monofosfata (*8-Br-cAMP*) i 8-bromoguanozin 3',5'-cikličnog monofosfata monofosfata (*8-Br-cGMP*) kao i aktiviranih endogenih fosfataza na *ATP*-aznu aktivnost Na^+/K^+ pumpe uzorci su preinkubirani 4 h u sledećim rastvorima:

- Uslovi koji inhibiraju procese fosforilacije i defosforilacije: 25 mM NaF, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA
- Dodavanje *8-Br-cGMP* i *8-Br-cAMP*: 5 mM ATP-Mg, 25 mM NaF i 2 mM *8-Br-cGMP* ili 2 mM *8-Br-cAMP*, da bi se stimulisali procesi fosforilacije
- Aktivacija endogenih protein fosfataza: 5 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , čime se stimuliše proces defosforilacije.

Fosfomolibdatni metod određivanja neorganskog fosfata (Pi)

Merilo *ATP*-azne aktivnosti Na^+/K^+ pumpe je oslobođeni neorganski fosfat (*Pi*) nastao kao rezultat razlaganja *ATP*-a na *ADP* + *Pi*. Koncentracija *Pi* određivana je kolorimetrijski pomoću reagenasa za bojenje. Amonijum molibdat/bakar sulfat reagensi za bojenje pripremljeni su na sledeći način:

- 2% askorbinska kiselina rastvorena u 2,5 M natrijum acetatnom puferu, $\text{pH}=4,1$ podešavana sirćetnom kiselinom (reagens A)
- 50% amonijum molibdat pripremljen u odnosu 1:1 sa 0,1% bakar sulfatom, filtriran 0,20 μm filterom i čuvan zaštićen od svetla (reagens B).

Kolorimetrijska kvantifikacija fosfata zasniva se na interakciji fosfata sa amonijum molibdatom, pri čemu se formira fosfomolibdatni kompleks. Ovaj kompleks se redukuje pomoću askorbinske kiseline stvarajući molibdensko plavi kompleks. Intenzitet boje kompleksa proporcionalan je koncentraciji neorganskog fosfata. Rastvori koji su korišćeni za određivanje standardne krive za fosfate sadržali su različite koncentracije KH_2PO_4 standarda u finalnoj zapremini od 200 μL : 50 mM Tris pH 7.4, 2

mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 0.05 mM CaCl₂, 10 mM NaF, 10 mM NaCl, 20 mM KCl, KH₂PO₄ (koncentracije u *mM*: 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 2).

Fosfatnim standardima dodavani su A i B reagensi za bojenje i nakon 10 *min* merena je apsorbanca na čitaču mikrotitarskih ploča na talasnoj dužini od 595 *nm*. Koeficijent pravca standardne krive za fosfate imao je vrednost 0,95.

Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određena metodom po *Bradfordu (1976)*. Za određivanje standardne krive za proteine korišćen je kao standard serum albumin govečeta (*BSA*) u koncentraciji 1 *mg/ml*. Pripremljene reakcione smeše inkubirane su 15 *min* na sobnoj temperaturi i potom je merena apsorbanca na talasnoj dužini od 595 *nm*. Bradfordova metoda je modifikovana za čitač mikrotitarskih pločica, tako da je odnos uzorak:boja bio 20:200 μ L.

Merenje aktivnosti Na⁺/K⁺ pumpe

Eksperimenti su izvođeni na sobnoj temperaturi (~22 °C). Sve reakcione smeše sadržale su 20 μ L uzorka u finalnoj zapremini od 200 μ L bunarčića mikrotitarskih pločica (*Linbro, ICN Biomedicals Inc, USA*). Rastvori za blank reakcije su pripremani bez *ATP-Mg*, izuzev u inkubacionim reakcijama za ispitivanje uticaja fosforilacije na aktivnost pumpe. Enzimske reakcije su otpočinjale dodavanjem *ATP-Mg*. Nakon 30 *min* reagensi A i B dodati su u reakcione smeše. Vezivanjem oslobođenog neorganskog fosfata reagensi su dobijali plavu boju. Intenzitet razvijene boje kvantifikovan je na talasnoj dužini od 595 *nm* pomoću čitača mikrotitar pločica i programa *DV990 "win6"* (*GDV*) 10 *min* nakon dodavanja reagenasa. Svi uzorci su mereni u triplikatu i srednja vrednost je korišćena za određivanje aktivnosti pumpe. Specifična aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe računata je na sledeći način:

$$\text{Specifična aktivnost pumpe} = \frac{A-B}{(t \cdot k \cdot c)}$$

gde su: A-apsorbanca reakcione smeše, B-apsorbanca blanka reakcione smeše, t-vreme inkubacije (30 *min*), k-koeficijent pravca standardne krive za fosfate, c- koncentracija proteina u uzorku. Aktivnost enzima izražavana je u μ mol *Pi/mg proteina u minuti*.

Sva jedinjenja korišćena za biohemijske eseje su od proizvođača *Sigma Aldrich* (*Taufkirchen, Germany*).

³¹P NMR EKSPERIMENTI

Uticao magnetnog polja jačine 10 *mT* na fosfatni metabolizam i *pH_i* u izolovanom okoloždrelnom ganglijskom kompleksu ispitivan je nuklearnom magnetnom spektroskopijom- ³¹P NMR. Poput eksperimentalnih uslova u biohemijskim eksperimentima i u NMR eksperimentima okoloždrelni ganglijski kompleksi izlagani su magnetnom polju u trajanju od 15 *min*, dok su kontrolni okoloždrelni ganglijski kompleksi bili u istim eksperimentalnim uslovima ali bez prisustva magnetnog polja.

Merenje fosfatnog metabolizma i pH_i u okoloždrelnom ganglijskom kompleksu

Za potrebe ³¹P NMR eksperimenata izolovani okoloždrelni kompleksi smeštani su u staklenu kivetu prečnika 10 *mm* koja je bila do odgovarajućeg nivoa ispunjena fiziološkim rastvorom za puža. Snimanje ³¹P NMR spektara vršeno je na *Apollo* (*Tecmag*)/*Bruker MSL 400* spektrometru, sa rezonantnom frekvencijom od 161,494 *MHz* za ³¹P jezgro. Korišćena je jednopulsna sekvenca sa pulsom (~45°) u trajanju od 10 *μs*, brzinom ponavljanja od 0,5 *s*, brojem ponavljanja 8000-10000 i vremenskim domenom od 2 *K* tačaka. Pre *Fourier*-ove transformacije vršeno je eksponencijalno množenje signala sa faktorom od 25 *Hz*. Pri navedenim uslovima snimanja ³¹P NMR signal je delimično zasićen. Tokom snimanja spektara (~60 *min*) izolovani okoloždrelni ganglijski kompleksi nalazili su se u delimično hipoksičnim uslovima. Kako su i kontrolni i izlagani okoloždrelni kompleksi prošli istu eksperimentalnu proceduru tokom NMR merenja, svaka promena u kontrolnom spektru posledica je uticaja magnetnog polja jačine 10 *mT*.

U eksperimentima u kojima je ispitivan uticaj magnetnog polja od 10 *mT* na fosfatni metabolizam nervnog sistema puža snimljeno je osam spektara, četiri kontrolna i četiri spektra nakon izlaganja okoloždrelnih ganglijskih kompleksa magnetnom polju. U eksperimentima sa amiloridom, u kojima je ispitivan efekat magnetnog polja na *pH_i*, snimljena su tri kontrolna i tri spektra nakon izlaganja okoloždrelnih ganglijskih

kompleksa magnetnom polju. Amilorid je rastvaran u fiziološkom rastvoru za puža u koncentraciji 1 mM i korišćen je kao blokator Na^+/H^+ izmenjivača (Goldstein i saradnici 2000). Vrednost $p\text{Hi}$ izolovanih ganglijskih kompleksa određivana je prema modifikovanoj proceduri opisanoj u Mimura i Kirino (1984). Za konstruisanje standardne krive koja se koristi za određivanje $p\text{Hi}$ potrebno je napraviti rastvore poznate pH vrednosti i odrediti hemijske pomake P_i signala za svaku ispitivanu pH. U te svrhe u fiziološki rastvor za puža dodavana 10 mM H_3PO_4 . Vrednost $p\text{Hi}$ merena je na osnovu hemijskog pomaka signala za neorganski fosfat (Kauppinen i Williams 1994). Hemijski pomak linija u fosforim spektrima određivan je u odnosu na spoljašnji standard tj. metilen difosfoničnu kiselinu (MDP) čiji je relativni hemijski pomak 17,05 ppm u odnosu na 85% H_3PO_4 . Površine signala fosfatnih jedinjenja određivane su pomoću programa *NTNMR* (Tecmag, USA) i normalizovane su na površinu referentnog *MDP* signala.

Sva jedinjenja korišćena za *NMR* eksperimente su od proizvođača *Sigma Aldrich* (Taufkirchen, Germany).

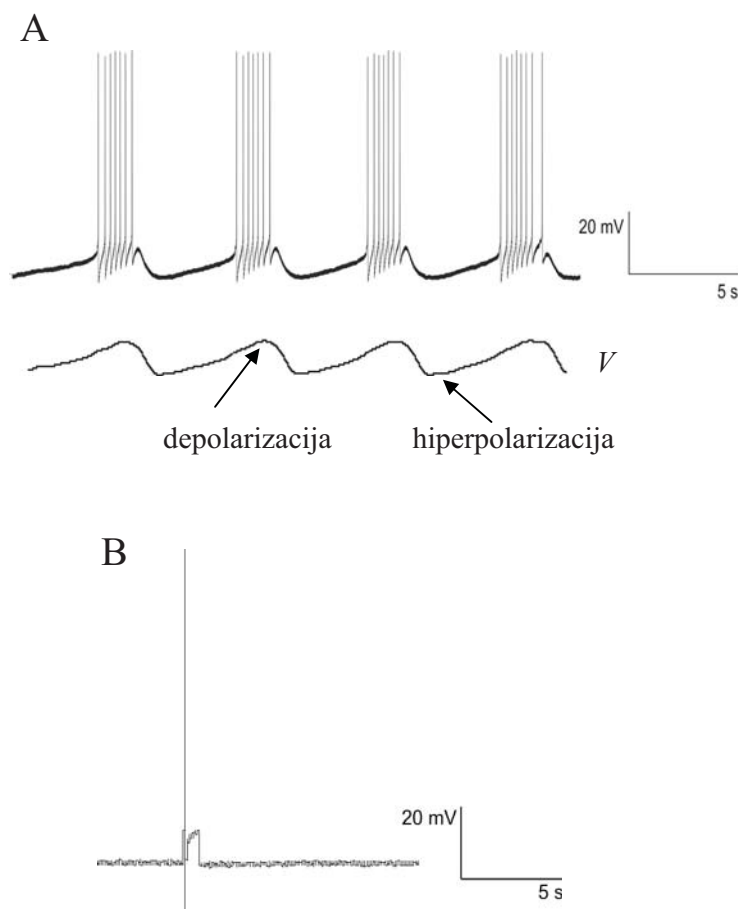
STATISTIČKA ANALIZA EKSPERIMENTALNIH PODATAKA

Statistička analiza podataka izvršena je u programu *SigmaPlot*. Za poređenja je korišćen studentov *t-test* za zavisne i nezavisne uzorke. Ukoliko podaci nisu imali normalnu raspodelu korišćen je *Wilcoxonov* test za zavisne ili *Mann Whitney* test za nezavisne uzorke. Kada su poređene tri grupe podataka korišćen je *ANOVA* test sa *Bonferonijevom* korekcijom. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno pomoću programa *MS Office*, *Corel Draw Graphics Suite* i *SigmaPlot*. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. Broj eksperimenata n , naglašen je u tekstu.

REZULTATI

UTICAJ MAGNETNOG POLJA JAČINE 2,7 mT I 10 mT NA BIOELEKTRIČNU AKTIVNOST Br I N1 NEURONA

U početnim eksperimentima ispitivan je uticaj statičkog magnetnog polja na dva neurona koje odlikuje različit tip bioelektrične aktivnosti, spontano aktivnom Br i nemom N1 neuronu. Za razliku od N1 neurona koji generiše akcione potencijale samo nakon depolarišuće stimulacije (Slika 16B), Br neuron spontano generiše paketiće akcionih potencijala praćene oscilacijama potencijala membrane (Slika 16A).



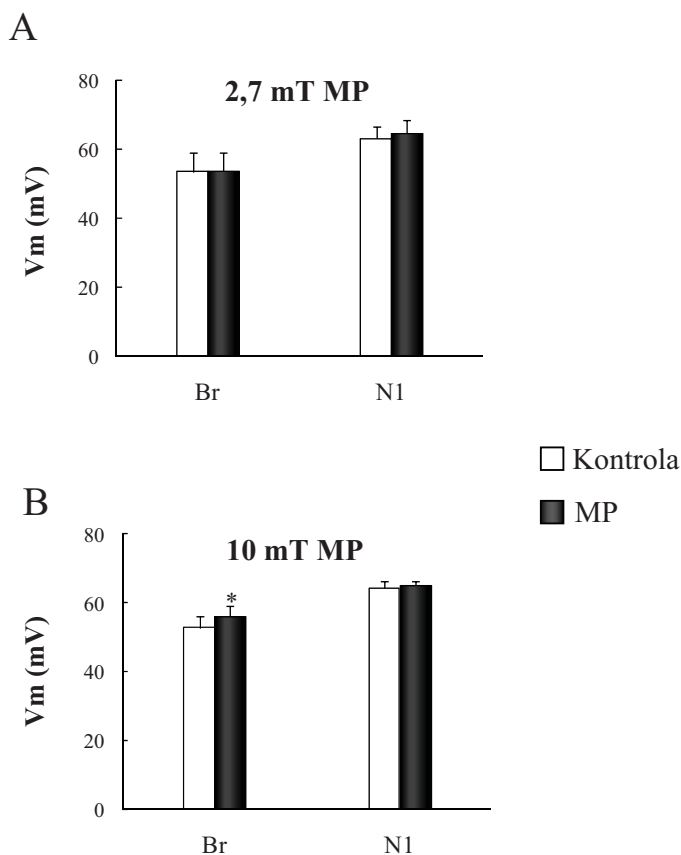
Slika 16. Intracelularno registrovana bioelektrična aktivnost Br i N1 neurona. A. Spontana bioelektrična aktivnost Br neurona (gornji zapis); ritmične promene potencijala membrane Br neurona izdvojene su filtriranjem signala niskopropusnim *Butterworth* filterom (*V_m*, donji zapis). B. Aktivnost N1 neurona. Akcioni potencijal je izazvan depolarišućim stimulusom.

Osnovni parametri za opisivanje bioelektrične aktivnosti spontano aktivnih i nemih

neurona su potencijal mirovanja membrane, amplituda i trajanje akcionih potencijala. Spontana bioelektrična aktivnost dodatno je okarakterisana frekvencijom akcionih potencijala. U početnom nizu eksperimenata ovi parametri su mereni kako bi se ispitalo uticaj magnetnog polja jačine 2,7 mT i 10 mT na bioelektričnu aktivnost Br i N1 neurona. Najpre su mereni bioelektrični parametri neurona nakon kratkotrajnog izlaganja slabijem magnetnom polju od 2,7 mT, a potom i nakon izlaganja jačem polju od 10 mT.

Potencijal mirovanja membrane

Rezultati dati na Slici 17 prikazuju uticaj magnetnog polja jačine 2,7 mT i 10 mT na potencijal mirovanja membrane Br i N1 neurona.



Slika 17. Potencijal mirovanja membrane (V_m) Br i N1 neurona u kontrolnom periodu i u magnetnom polju (MP). A. Magnetno polje od 2,7 mT. Promene potencijala mirovanja membrane Br i N1 neurona nisu statistički značajne ($p=0,74$ za Br neuron $n=5$, i $p=0,38$ za N1 neuron $n=4$, t -test za zavisne uzorke). B. Magnetno polje od 10 mT. Promena potencijala mirovanja membrane Br neurona je statistički značajna ($*p=0,049$, $n=5$, t -test za zavisne uzorke). Potencijal membrane N1 neurona nije promenjen ($p=0,41$, $n=5$, t -test za zavisne uzorke). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška.

U kontrolnim uslovima vrednost potencijala mirovanja membrane Br neurona je niža, što je osobina spontano aktivnih neurona, u odnosu na višu vrednost potencijala mirovanja membrane N1 neurona koja karakteriše neme neurone (Slika 17A i B).

Potencijal mirovanja membrane Br neurona nije se značajno promenio u magnetnom polju od 2,7 mT. Vrednosti ispitivanog bioelektričnog parametra u kontrolnim uslovima i u magnetnom polju od 2,7 mT su $-53,63 \pm 5,54$ mV, odnosno $-54,09 \pm 4,97$ mV (Slika 17A, n=5). Izlaganje jačem magnetnom polju dovelo je do hiperpolarizacije membrane Br neurona. U odnosu na kontrolnu vrednost od $-52,92 \pm 3,29$ mV, potencijal mirovanja membrane Br neurona se značajno povećao do vrednosti od $-56,17 \pm 3,12$ mV (Slika 17B, n=5). Hiperpolarizacija membrane uočena je i 20 min nakon završetka izlaganja Br neurona magnetnom polju od 10 mT (Tabela 2).

Tabela 2. Hiperpolarizacija membrane Br neurona tokom perioda od 20 min nakon petnaestominutnog izlaganja magnetnom polju jačine 10 mT

Vreme po završetku izlaganja (min)	5	10	15	20
Hiperpolarizacija membrane (mV)	$3,35 \pm 1,82^*$	$3,37 \pm 0,94^*$	$3,76 \pm 0,94^*$	$3,97 \pm 1,05^*$

Hiperpolarizacija membrane Br neurona izmerena u 5', 10', 15' i 20' po završetku izlaganja neurona magnetnom polju od 10 mT. Promene potencijala membrane su statistički značajne $*p < 0,05$, n=5, *t-test* za zavisne uzorke. Poređenja su vršena sa vrednost potencijala mirovanja u kontrolnim uslovima. Prikazane su srednje vrednosti promene potencijala \pm standardna greška. Hiperpolarizacija u magnetnom polju iznosi 3,25 mV.

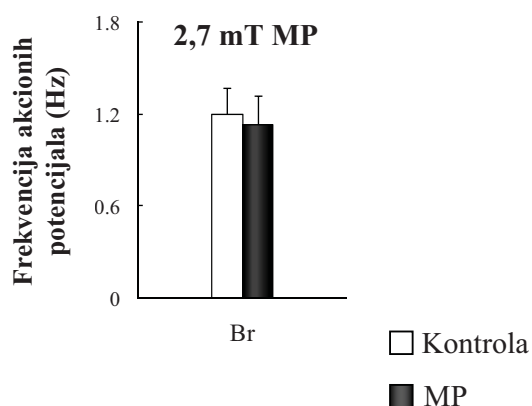
Izlaganje magnetnom polju jačine 2,7 mT i 10 mT nije dovelo do značajnih promena potencijala mirovanja membrane N1 neurona. Vrednost potencijala mirovanja membrane u kontrolnim uslovima iznosi $-63,36 \pm 3,52$ mV, dok u magnetnom polju od 2,7 mT ima vrednost od $-64,72 \pm 3,78$ mV (Slika 17A, n=4). Takođe, potencijal mirovanja membrane N1 neurona u kontrolnim uslovima ima vrednost od $-64,47 \pm 2,02$ mV, a po izlaganju magnetnom polju jačine 10 mT vrednost od $-65,28 \pm 1,26$ mV (Slika 17B, n=4).

Frekvencija akcionih potencijala

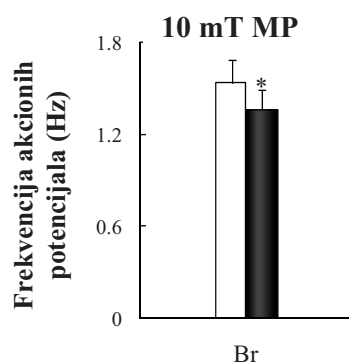
Generisanje akcionih potencijala spontano aktivnih neurona opisuje se pomoću frekvencije. Stoga je meren uticaj magnetnog polja na frekvenciju akcionih potencijala u Br neuronu. U odnosu na kontrolnu vrednost od $1,2 \pm 0,17$ Hz, magnetno polje od 2,7

mT smanjilo je frekvenciju akcionih potencijala Br neurona za 5,83% do vrednosti od $1,13 \pm 0,18 \text{ Hz}$, međutim ova promena nije statistički značajna (Slika 18A, $n=5$). Značajno smanjenje frekvencije akcionih potencijala Br neurona uočeno je u magnetnom polju od 10 mT (Slika 18B, $n=5$). U odnosu na kontrolnu vrednost od $1,54 \pm 0,15 \text{ Hz}$, promena frekvencije akcionih potencijala do vrednosti od $1,36 \pm 0,13 \text{ Hz}$ u magnetnom polju od 10 mT , predstavlja smanjenje frekvencije za 11,69%. Sa Slike 18 može se uočiti da se frekvencije akcionih potencijala Br neurona razlikuju u kontrolnim periodima. Međutim, ove razlike nisu statistički značajne i posledica su individualnih varijacija u trajanju intervala između paketića akcionih potencijala različitih Br neurona.

A



B



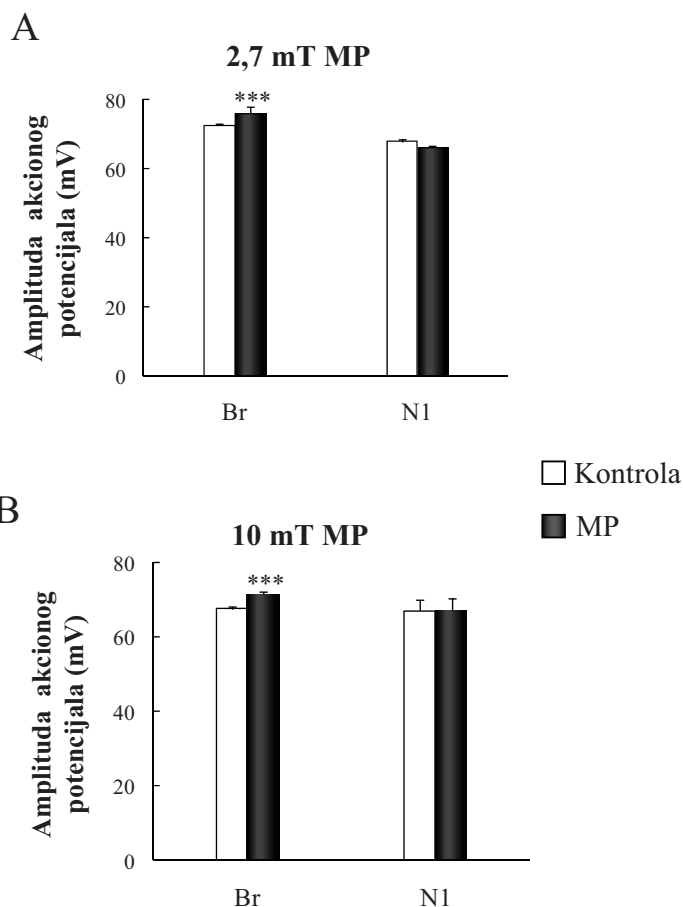
Slika 18. Frekvencija akcionih potencijala Br neurona u kontrolnom periodu i tokom izlaganja magnetnom polju (MP). Frekvencija je merena za period od 1'-5' u kontrolnim uslovima i 10'-15' tokom izlaganja magnetnom polju. A. Magnetno polje od 2,7 mT. Smanjenje frekvencije akcionih potencijala Br neurona nije statistički značajno ($p=0,84$, $n=5$, *Wilcoxon* test). B. Magnetno polje od 10 mT. Smanjenje frekvencije akcionih potencijala Br neurona je statistički značajno ($*p=0,043$, $n=5$, *t-test* za zavisne uzorke). Između frekvencija akcionih potencijala u kontrolnim uslovima nema statistički značajne razlike ($p=0,187$, *t-test*). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna greška.

U odnosu na vrednost frekvencije u kontrolnim uslovima, frekvencije akcionih potencijala Br neurona u periodima od 1-5 min i 15-20 min nakon završetka izlaganja

neurona magnetnom polju od 10 mT smanjene su do vrednosti od $0,22 \pm 0,07$ Hz (14,28%), odnosno $0,27 \pm 0,07$ Hz (17,53%). Promene su statistički značajne ($p < 0,05$, t-test za zavisne uzorke).

Amplituda akcionog potencijala

Ispitan je i efekat magnetnog polja jačine 2,7 mT i 10 mT na amplitudu spontano generisanog akcionog potencijala Br neurona i akcionog potencijala N1 neurona izazvanog depolarišućim stimulusom (Slika 19).



Slika 19. Amplituda akcionog potencijala Br i N1 neurona u kontrolnom periodu i tokom izlaganja magnetnom polju (MP). A. Magnetno polje od 2,7 mT. Povećanje amplitude akcionog potencijala Br neurona je statistički značajno ($***p < 0,001$, $n=5$, t-test za zavisne uzorke.). Promena amplitude akcionog potencijala N1 neurona nije statistički značajna ($p=0,49$, $n=4$, t-test za zavisne uzorke.). B. Magnetno polje od 10 mT. Povećanje amplitude akcionog potencijala Br neurona je statistički značajno ($***p < 0,001$, $n=5$, t-test za zavisne uzorke.). Amplituda akcionog potencijala N1 neurona se nije značajno promenila ($p=0,88$, $n=5$, t-test za zavisne uzorke.). Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna greška.

U odnosu na kontrolnu vrednost od $72,77 \pm 0,53 \text{ mV}$, magnetno polje od $2,7 \text{ mT}$ značajno je povećalo amplitudu akcionog potencijala Br neurona do vrednosti od $76,11 \pm 0,58 \text{ mV}$ (Slika 19A, $n=5$). Slične promene uočene su i tokom izlaganja Br neurona magnetnom polju od 10 mT . Razlika između vrednosti amplitude akcionog potencijala Br neurona u kontrolnim uslovima ($67,49 \pm 0,67 \text{ mV}$) i vrednosti amplitude u magnetnom polju od 10 mT ($71,76 \pm 0,46 \text{ mV}$), statistički je značajna (Slika 19B, $n=5$). Izmerena promena amplitude akcionog potencijala u magnetnom polju od $2,7 \text{ mT}$ i 10 mT , ukazivala je da je efekat polja na ovaj parametar srazmeran njegovoj jačini. Naime, u magnetnom polju od $2,7 \text{ mT}$ izmereno je povećanje amplitude akcionog potencijala Br neurona od $4,59\%$, dok je u magnetnom polju od 10 mT izmereno povećanje od $6,32\%$. Povećanje amplitude akcionog potencijala zapaženo je i 20 min nakon završetka izlaganja Br neurona magnetnom polju od $2,7 \text{ mT}$ i 10 mT . Izmerene promene amplitude date su u Tabeli 3.

Tabela 3. Povećanje amplitude akcionog potencijala Br neurona tokom perioda od 20 min nakon završetka izlaganja magnetnom polju jačine 2,7 mT i 10 mT

Vreme po završetku izlaganja (min)		5	10	15	20
Povećanje amplitude akcionog potencijala (mV)	2,7 mT	$2,87 \pm 0,19^{***}$	$3,08 \pm 0,17^{***}$	$3,75 \pm 0,25^{***}$	$3,64 \pm 0,25^{***}$
	10 mT	$5,07 \pm 0,35^{***}$	$5,23 \pm 0,39^{***}$	$6,88 \pm 0,33^{***}$	$6,75 \pm 0,31^{***}$

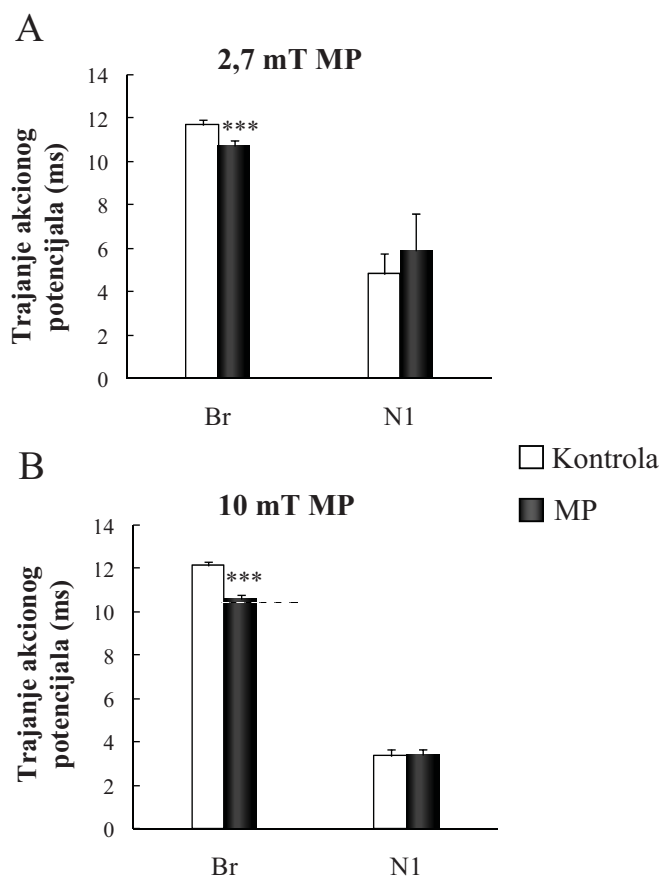
Povećanje amplitude akcionog potencijala Br neurona izmereno u $5'$, $10'$, $15'$ i $20'$ nakon završetka izlaganja magnetnom polju od $2,7 \text{ mT}$ ($n=5$) i 10 mT ($n=5$). Promene amplitude akcionog potencijala su statistički značajne $***p < 0,001$, *Wilcoxon* test, *t-test* za zavisne uzorke. Poređenja su vršena sa amplitudom akcionog potencijala u kontrolnim uslovima. Prikazane su srednje vrednosti promene amplitude \pm standardna greška. Povećanje amplitude akcionog potencijala u magnetnom polju od $2,7 \text{ mT}$ je $3,34 \text{ mV}$, dok je u polju od 10 mT $4,27 \text{ mV}$.

Vrednosti amplitude izazvanog akcionog potencijala N1 neurona u kontrolnim uslovima ($67,99 \pm 1,96 \text{ mV}$) i u magnetnom polju jačine $2,7 \text{ mT}$ ($66,26 \pm 0,51 \text{ mV}$), nisu se značajno razlikovale (Slika 19A, $n=4$). Amplituda izazvanog akcionog potencijala N1 neurona nije se promenila ni u magnetnom polju od 10 mT . Kao što se može videti sa Slike 19B između vrednosti amplitude u kontrolnim uslovima ($67,07 \pm 3,15 \text{ mV}$) i vrednosti amplitude akcionog potencijala u magnetnom polju ($67,14 \pm 3,2 \text{ mV}$) nema značajne razlike ($n=5$).

Trajanje akcionog potencijala

Ispitujući dalje efekte magnetnih polja mereno je trajanje akcionog potencijala. I za ovaj parametar bioelektrične aktivnosti, kod Br neurona, ali ne i kod N1 neurona, uočena je značajna promena.

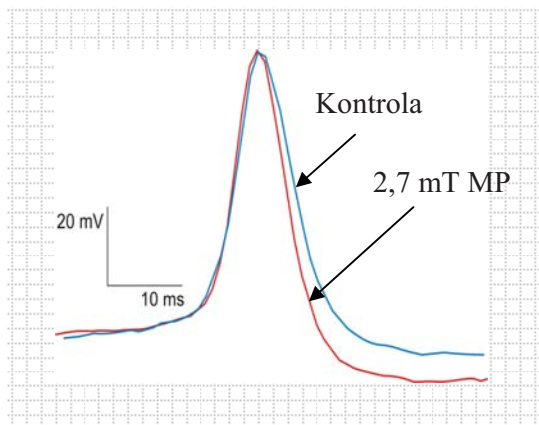
U odnosu na kontrolnu vrednost od $11,71 \pm 0,2$ ms, u magnetnom polju od $2,7$ mT izmereno je značajno smanjenje trajanja akcionog potencijala do vrednosti od $10,75 \pm 0,2$ ms (Slika 20A, $n=5$). Slično, u odnosu na kontrolnu vrednost od $12,15 \pm 0,2$ ms, smanjenje trajanja akcionog potencijala Br neurona do vrednosti od $10,64 \pm 0,2$ ms u magnetnom polju od 10 mT, takođe je statistički značajno (Slika 20B, $n=5$).



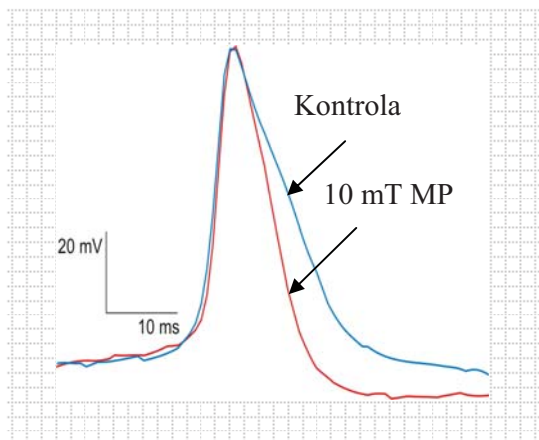
Slika 20. Trajanja akcionog potencijala akcionog potencijala Br i N1 neurona u kontrolnom periodu i u magnetnom polju (MP). A. Magnetno polje od $2,7$ mT. Smanjenje trajanja akcionog potencijala Br neurona statistički je značajno ($***p < 0,001$, *Wilcoxon* test, $n=5$). Promena trajanja akcionog potencijala N1 neurona nije statistički značajna ($p=0,32$, $n=4$, *t-test* za zavisne uzorke). B. Magnetno polje od 10 mT. Smanjenje trajanja akcionog potencijala Br neurona je statistički značajno ($***p < 0,001$, $n=5$, *Wilcoxon* test). Trajanje akcionog potencijala N1 neurona nije promenjeno ($p=0,88$, $n=5$, *t-test* za zavisne uzorke). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Slično kao i za amplitudu, promena trajanja akcionog potencijala Br neurona u magnetnom polju od 2,7 mT i 10 mT ukazivala je da je efekat magnetnog polja i na ovaj bioelektrični parametar srazmeran njegovoj jačini (Slika 21). U magnetnom polju od 2,7 mT izmereno je smanjenje trajanja akcionog potencijala od 8.2% (n=5), dok je u magnetnom polju od 10 mT izmereno smanjenje od 12.44% (n=5).

A



B



Slika 21. Prikaz poravnatih zapisa akcionih potencijala Br neurona uzetih sa istih pozicija (prvi akcioni potencijal u paketiću) u kontrolnom periodu i u magnetnom polju (MP) od 2,7 mT (A) i 10 mT (B). Zapisi su poravnati u odnosu na početak uzlazne faze akcionog potencijala. Smanjenje trajanja akcionog potencijala zavisno je od jačine magnetnog polja.

Smanjenje trajanja akcionog potencijala Br neurona izmereno je i u toku perioda od 20 min nakon izlaganja neurona magnetnom polju od 2,7 mT i 10 mT. Izmerene promene u trajanju akcionog potencijala date su u Tabeli 4.

Tabela 4. Smanjenje trajanja akcionog potencijala Br neurona tokom perioda od 20 min nakon petnaestominutnog izlaganja magnetnom polju jačine 2,7 mT i 10 mT

Vreme po završetku izlaganja (min)		5	10	15	20
Smanjenje trajanja akcionog potencijala (ms)	2,7 mT	0,08±0,23	0,75±0,13***	0,83±0,23***	0,54±0,22*
	10 mT	1,99±0,26***	1,65±0,25***	1,5±0,23***	1,13±0,24***

Smanjenje trajanja akcionog potencijala Br neurona izmereno u 5', 10', 15' i 20' nakon završetka izlaganja neurona magnetnom polju od 2,7 mT (n=5) i 10 mT (n=5). Sem u 5' nakon izlaganja magnetnom polju od 2,7 mT (p=0.94, *Wilcoxon test*) promene u trajanju AP-a su statistički značajne *p<0,05, ***p<0,001 *Wilcoxon test*. Poređenja su vršena sa vrednošću trajanja AP-a u kontrolnim uslovima. Prikazane su srednje vrednosti promene trajanja ± standardna greška. Smanjenje trajanja AP-a u magnetnom polju od 2,7 mT je 0,96 ms, dok je u polju od 10 mT 1,5 ms.

Za razliku od efekta magnetnog polja na trajanje akcionog potencijala Br neurona, sa Slike 20A se može videti da je magnetno polje od 2,7 mT dovelo do širenja izazvanog akcionog potencijala N1 neurona, ali ova promena nije bila statistički značajna. U odnosu na trajanje akcionog potencijala u kontrolnim uslovima čija je vrednost 4,85±0,9 ms, trajanje akcionog potencijala u magnetnom polju od 2,7 mT ima vrednost 5,88±1,8 ms (n=4). Trajanje izazvanog akcionog potencijala N1 neurona u kontrolnim uslovima čija je vrednost 3,41±0,3 ms, nije se značajno promenilo u odnosu na vrednost od 3,4±0,3 ms u magnetnom polju od 10 mT (Slika 20B, n=5).

Dobijeni rezultati pokazuju da magnetno polje jačine 2,7 mT i 10 mT ne dovodi do promene bioelektrične aktivnosti oba ispitivana neurona. Kako su promene uočene samo kod spontano aktivnog Br neurona i kako je jače magnetno polje izazivalo promene u svim ispitivanim bioelektričnim parametrima Br neurona, naredni eksperimenti izvođeni su samo na Br neuronu i detaljnije je ispitan efekat magnetnog polja od 10 mT.

UTICAJ MAGNETNOG POLJA JAČINE 10 mT NA AKTIVNOST Na⁺/K⁺ PUMPE

Hiperpolarizacija membrane, povećanje amplitude, kao i smanjenje frekvencije i trajanja akcionog potencijala Br neurona tokom kratkotrajnog izlaganja magnetnom polju od 10 mT, ukazivale su na značajnu ulogu Na⁺/K⁺ pumpe u opisanim promenama

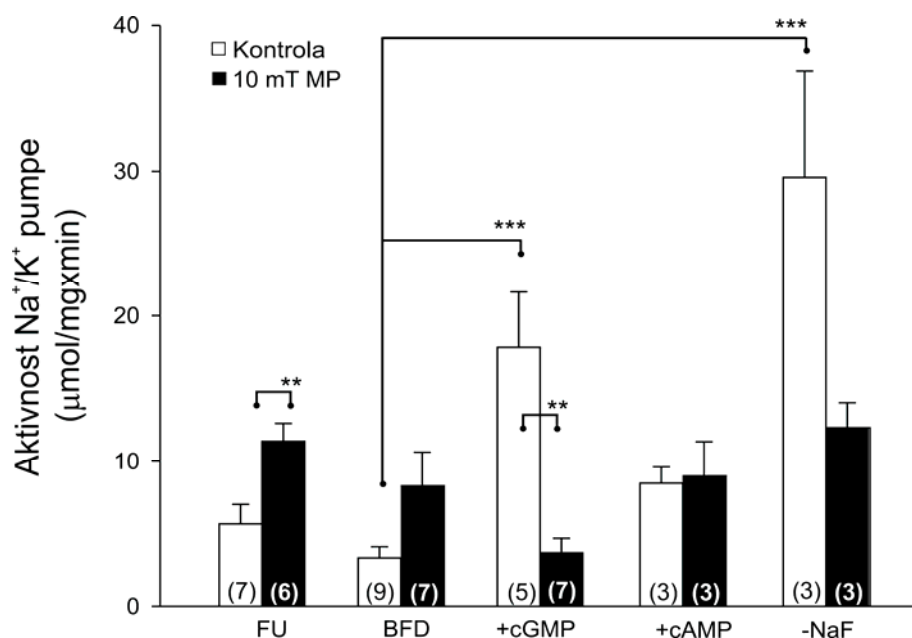
ispitivanih bioelektričnih parametara (*Carpenter i Alving 1968, Willis i saradnici 1974, Gadsby i Cranefield 1979, Gadsby 1985, Alvarez-Leefmans i saradnici 1994*). Stoga je u narednom nizu eksperimenata istražen uticaj magnetnog polja od 10 *mT* na aktivnost Na^+/K^+ pumpe, najpre u okoloždrelnom ganglijskom kompleksu, a potom i na Br neuronu.

Uticaj magnetnog polja jačine 10 *mT* na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u okoloždrelnom ganglijskom kompleksu

Biohemijska analiza

U odnosu na kontrolnu vrednost od $5,7 \pm 1,3 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ ($n=7$) u osnovnim fiziološkim uslovima (FU, Slika 22), magnetno polje od 10 *mT* značajno je povećalo aktivnost Na^+/K^+ pumpe u okoloždrelnom ganglijskom kompleksu do vrednosti od $11,4 \pm 1,2 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ ($n=6$). S obzirom da su ganglijski kompleksi izlagani magnetnom polju u trajanju od 15 *min*, može se pretpostaviti da su neki od mehanizama kratkotrajne regulacije aktivnosti pumpe odgovorni za uočeno povećanje njene aktivnosti pod uticajem magnetnog polja. Stoga je u narednim eksperimentima ispitivan uticaj procesa fosforilacije i defosforilacije na aktivnost pumpe. Najpre je izmerena aktivnost pumpe u eksperimentalnim uslovima u kojima su blokirani procesi fosforilacije i defosforilacije. Blokiranjem procesa fosforilacije i defosforilacije (BFD uslovi, Slika 22) aktivnost Na^+/K^+ pumpe se smanjila i u kontrolnim ($3,31 \pm 0,85 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, $n=9$) i u okoloždrelnim ganglijskim kompleksima koji su izloženi magnetnom polju od 10 *mT* ($8,29 \pm 2,34 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, $n=7$). Iako smanjena, aktivnost Na^+/K^+ pumpe u kontrolnim BFD uslovima nije bila značajno različita od aktivnosti pumpe u kontrolnim fiziološkim uslovima, ($p=0,13$, *t-test*). Slično, nije bilo razlike ni u aktivnosti pumpe u fiziološkim i BFD uslovima u magnetnom polju od 10 *mT* ($p=0,29$, *Mann-Whitney test*). Razlika u aktivnosti Na^+/K^+ pumpe između BFD uslova u kontroli i nakon izlaganja magnetnom polju nije značajna ($p=0,054$, *t-test*) što je ukazivalo da je efekat magnetnog polja od 10 *mT* na aktivnost Na^+/K^+ pumpe, posredovan nekim od procesa koji su blokirani u BFD uslovima. Stoga je u narednim eksperimentima ispitivana aktivnost Na^+/K^+ pumpe u uslovima kada su aktivirani signalni putevi regulisani protein kinazom G (+cGMP uslovi), protein kinazom A (+cAMP uslovi) i

endogenim fosfatazama (-NaF uslovi). Najpre su ispitane promene u kontrolnim okoloždrelnim ganglijskim kompleksima.



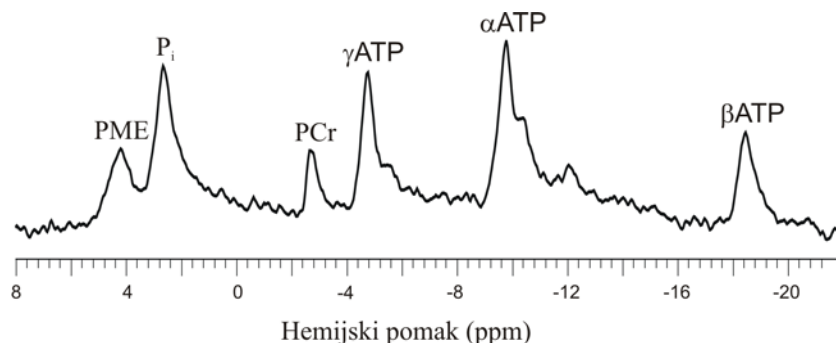
Slika 22. Uticaj magnetnog polja od 10 mT (MP) na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u izolovanom okoloždrelnom ganglijskom kompleksu u osnovnim fiziološkim uslovima (FU), eksperimentalnim uslovima u kojima su blokirani procesi forofilacije i defosforilacije (BFD) i uslovima kada su aktivirani signalni putevi regulisani protein kinazom G (+cGMP), protein kinazom A (+cAMP) i endogenim fosfatazama (-NaF). ** $p=0,009$, *t-test*, *** $p<0,001$, ANOVA test sa Bonferonijevom korekcijom, označavaju statistički značajne razlike između poređenih grupa. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška i dobijeni su iz nezavisnih eksperimenata (broj okoloždrelnih ganglijskih kompleksa u eksperimentima dat je brojem u stubićima).

Aktivnost Na^+/K^+ pumpe u +cGMP ($17,8 \pm 3,8 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, $n=5$) i -NaF eksperimentalnim uslovima ($29,6 \pm 7,3 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, $n=3$) bila je značajno povećana u odnosu na aktivnost pumpe u kontrolnim BFD uslovima (Slika 22). Promena aktivnosti pumpe u +cAMP uslovima ($8,5 \pm 1,1 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, $n=3$) nije značajna u poređenju sa kontrolnim BFD uslovima ($p>0,05$ ANOVA test, Slika 22). Aktivacija kinaza i fosfataza u okoloždrelnim ganglijskim kompleksima koji su izloženi magnetnom polju od 10 mT nije značajno promenila aktivnost Na^+/K^+ pumpe. Naime, aktivnost Na^+/K^+ pumpe u +cGMP ($3,6 \pm 1,1 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, $n=7$), u +cAMP ($8,9 \pm 2,4 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, $n=3$) i u -NaF ($12,3 \pm 1,7 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$, $n=3$) eksperimentalnim uslovima nije značajno različita u poređenju sa aktivnošću pumpe u BFD uslovima u magnetnom polju ($p>0,05$, ANOVA test, Slika 22). Poređenje između kontrolnih i okoloždrelnih ganglijskih kompleksa

izloženih magnetnom polju od 10 *mT* u svakom od eksperimentalnih uslova (Slika 22), pokazalo je da je nakon aktivacije +cGMP signalnog puta aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe značajno različita između poređenih grupa, dok aktivacija +cAMP i -NaF signalnih puteva nije značajno promenila aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe (*p*>0,05 *ANOVA test*).

³¹P NMR eksperimenti

U nervnom sistemu Na⁺/K⁺ pumpa je najveći potrošač energije. Nakon što je uočeno da magnetno polje od 10 *mT* povećava aktivnosti Na⁺/K⁺ pumpe u okoloždrelnom ganglijskom kompleksu (Slika 22), u narednim eksperimentima, ispitan je uticaj magnetnog polja na fosfatni metabolizam u nervnom sistemu puža. Dobijeni ³¹P NMR spektar izolovanih okoloždrelnih kompleksa prikazan je na Slici 23.



Slika 23. Kontrolni ³¹P NMR spektar okoloždrelnog ganglijskog kompleksa puža. Uočeni signali dodeljeni su sledećim jedinjenjima: fofomonoestrima (PME), neorganskom fosfatu (Pi), fosfokreatininu (PCr), γ ATP (γ ATP+ β ADP), α ATP (α ADP + ATP) i β ATP-u.

Obeležavanje uočenih signala u spektru izvršeno je na osnovu poređenja sa spektrima nervnog sistema drugih vrsta (*Kauppinen i Williams, 1994; McNamara i saradnici 1994; Tsuji i saradnici 1995; Buck i saradnici 1998; Tsao i saradnici 1999*). Na hemijskom pomaku 4,4 *ppm* je signal fosfomonoestara (PME). Signal neorganskog fosfata (Pi) nalazi se na 2,6 *ppm*, dok je signal fosfokreatinina (PCr) na -2,7 *ppm*. Signal α fosfata nukleotid dva- i trifosfata je na -9,8 *ppm* (α ATP), β fosfata nukleotid tri fosfata (β ATP) na -18,4 *ppm*, dok je signal γ fosfata nukleotid trifosfata i β fosfata nukleotid dvafosfata na -4,7 *ppm* (γ ATP). Kako se γ i α ATP signali preklapaju sa signalima ADP-a, za praćenje energetskog metabolizma je korišćen β ATP signal jer površina ovog signala najbolje odražava promene u koncentraciji ATP-a (*Stubbs i saradnici 1996*).

Izlaganje magnetnom polju od 10 *mT* nije dovelo do izrazitih promena u fosfatnom metabolizmu izolovanih okoloždrelnih ganglijskih kompleksa (Tabela 5).

Tabela 5. Površine ³¹P NMR signala u kontrolnim uslovima i nakon izlaganja magnetnom polju od 10 mT

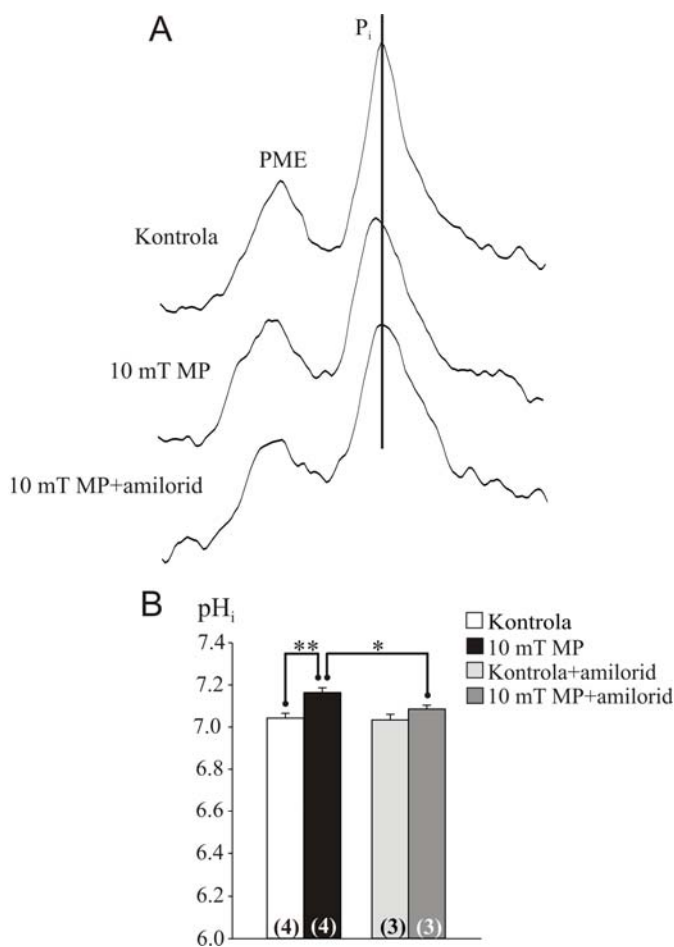
³¹ P NMR signal	Kontrola	10 mT MP
PME	1,29±0,25	1,19±0,22
P _i	1,77±0,41	1,84±0,23
PCr	1,17±0,35	0,99±0,15
γATP	1,59±0,31	1,84±0,14
Aatp	2,35±0,06	2,59±0,11
βATP	1,42±0,22	1,26±0,19

Površine signala kontrolnih (n=4 spektra) i okoloždrelnih kompleksa izloženih magnetnom polju od 10 mT (n=4 spektra). Promene izazvane magnetnim poljem od 10 mT nisu značajne (p>0,05, *t-test*). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška.

Sadržaj fosfatnih jedinjenja, u kontrolnim uslovima i u uslovima izlaganja magnetnom polju, ne razlikuju se značajno. Iako promena ne dostiže statističku značajnost, smanjenje površine β *ATP* signala za 11,26% ukazuje na povećanu potrošnju *ATP-a* u ganglijskom kompleksu izlaganom magnetnom polju. Takođe, odnos površina β*ATP*/γ*ATP* signala koji je indikator *ATP/ADP* odnosa, dodatno ukazuje na povećanu potrošnju *ATP-a* u ganglijskom kompleksu izlaganom magnetnom polju. Naime, u odnosu na vrednost u kontrolnim uslovima od 0,94 (n=4 spektra), ovaj odnos je bio niži u magnetnom polju i imao je vrednost od 0,67 (n=4 spektra).

Ispitujući dalje efekat magnetnog polja od 10 *mT* u nervnom sistemu puža uočena je promena u *pH_i* (Slika 24). Izlaganje magnetnom polju dovelo je do promena u hemijskom pomaku *P_i* signala (Slika 24A) sa vrednosti od 2,66 *ppm* u kontrolnim spektrima (n=4 spektra) do vrednosti od 2,85 *ppm* u spektrima snimanim nakon izlaganja okoloždrelnog ganglijskog kompleksa magnetnom polju (n=4 spektra). U odnosu na kontrolnu vrednost od 7,04±0,02, ova promena u hemijskom pomaku

predstavlja statistički značajnu promenu pH_i do vrednosti od $7,16 \pm 0,02$ u magnetnom polju. Da bi se ispitalo da li Na^+/H^+ izmenjivač, pH_i regulatorni sistem zavistan od gradijenta Na^+ jona, doprinosi opisanoj promeni pH_i , snimani su spektri sa amiloridom (Slika 24). Blokiranje Na^+/H^+ izmenjivača amiloridom ($n=3$ spektra) značajno je smanjilo pH_i okoždrelnog ganglijskog kompleksa izloženog magnetnom polju od 10 mT do vrednosti od $7,08 \pm 0,02$ koja se ne razlikuje značajno od kontrolne pH_i vrednosti ($p=0,229$ t-test). Odgovarajući hemijski pomak P_i signala u spektrima sa amiloridom je 2,72 ppm. Takvi rezultati ukazuju da je aktivnost Na^+/H^+ izmenjivača u nervnom sistemu puža povećana nakon izlaganja magnetnom polju od 10 mT.



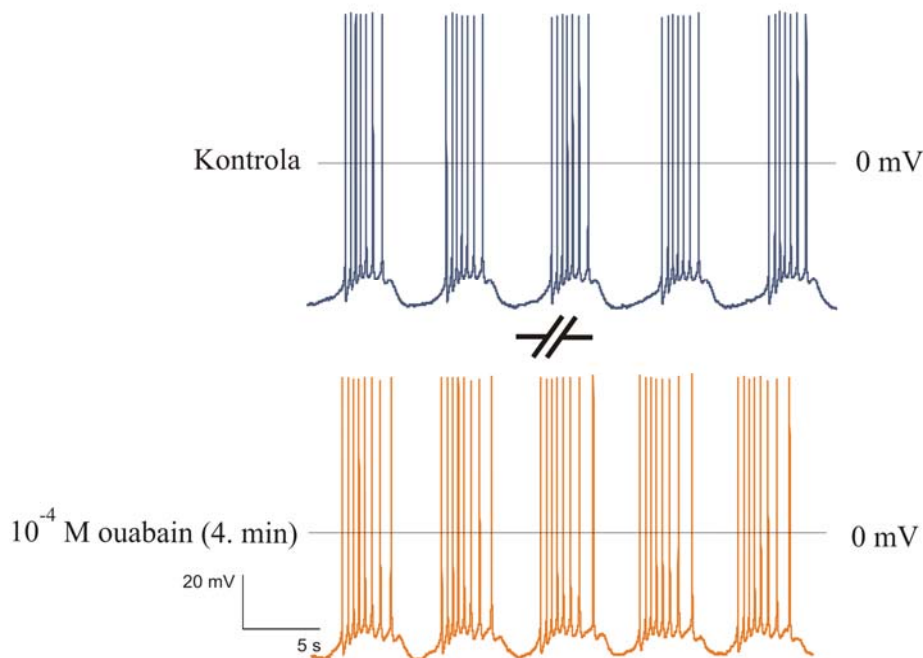
Slika 24. Uticaj magnetnog polja od 10 mT (MP) na pH_i u okoždrelnom ganglijskom kompleksu. A. Uvećani deo ^{31}P NMR spektra iz kontrolnih i okoždrelnih ganglijskih kompleksa izloženih magnetnom polju pokazuje hemijski pomak P_i signala (vertikalna linija). B. Magnetno polje od 10 mT je statistički značajno povećalo pH_i vrednost za 0,12 jedinica ($*p=0,039$ t-test). Amilorid je statistički značajno smanjio pH_i okoždrelnih ganglijskih kompleksa izloženih magnetnom polju ($p=0,039$, t-test). Broj ^{31}P NMR spektara u eksperimentima prikazan je u stubićima.

Podaci iz literature pokazuju da je aktivnost Na^+/H^+ izmenjivača niska u osnovnim fiziološkim uslovima, dok igra značajnu ulogu u uslovima u kojima se fiziološki pH_i značajno menja (*Willoughby i saradnici 1999*). U skladu sa tim, amilorid nije značajno promenio pH_i vrednost kontrolnih okoždrelnih ganglijskih kompleksa, jer je vrednost pH_i u kontrolnim uslovima sa amiloridom $7,03 \pm 0,02$ ($n=3$ spektra) slična vrednosti u kontrolnim uslovima bez amilorida ($p=0,81$ *t-test*). Hemijski pomak P_i signala u kontrolnim spektrima sa amiloridom je $2,64$ ppm.

Uticaj magnetnog polja jačine 10 mT na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu

Aktivnost Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu u kontrolnim uslovima

Nakon što je uočeno da magnetno polje jačine 10 mT povećava aktivnost Na^+/K^+ pumpe u okoždrelnom ganglijskom kompleksu, u narednom nizu eksperimenata ispitan je uticaj ovog polja na aktivnost pumpe u Br neuronu. Najpre je ispitan uloga Na^+/K^+ pumpe u regulaciji bioelektrične aktivnosti Br neurona u kontrolnim uslovima (Slika 25). Pumpa je blokirana ouabainom i izmereni su dodatni parametri koji su detaljnije karakterisali spontanu aktivnost Br neurona.



Slika 25. Intracelularno registrovana aktivnost Br neurona u kontrolnim uslovima i 4 min nakon dodavanja ouabaina.

Bioelektrična aktivnost Br neurona može se opisati kao niz paketića akcionih potencijala i hiperpolarizirajućih intervala između paketića tokom kojih ne dolazi do generisanja akcionih potencijala. Nakon poslednjeg akcionog potencijala u paketiću, depolarizacija membrane ne dovodi do stvaranja akcionih potencijala i dolazi do hiperpolarizacije membrane. Hiperpolarizacija se postepeno smanjuje dok membranski potencijal ne dostigne prag za generisanje novog paketića akcionih potencijala. Na Slici 25, prikazana su promene spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona koje su nastale pri dodavanju ouabaina. Blokiranje Na^+/K^+ pumpe dovelo je do depolarizacije maksimalne vrednosti potencijala mirovanja membrane (V_{max}), povećanja trajanja paketića, smanjenja trajanja intervala između paketića akcionih potencijala, smanjenja amplitude hiperpolarizacije i povećanja frekvencije akcionih potencijala Br neurona. Opisane promene bioelektričnih parametara Br neurona u kontrolnim uslovima (n=7) koje su nastale nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe ouabainom su statistički značajne (Tabela 6).

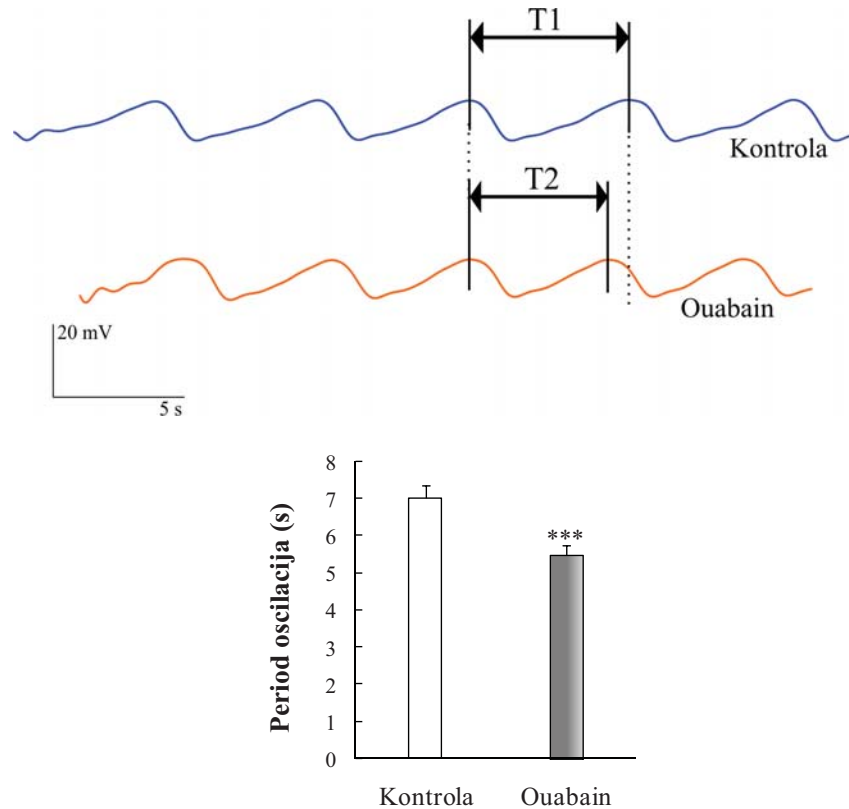
Tabela 6. Efekat ouabaina na spontanu bioelektričnu aktivnost Br neurona u kontrolnim uslovima

Bioelektrična aktivnost Br neurona	Kontrola	10^{-4} M ouabain
V_{max} (mV)	$-50,9 \pm 0,36$	$-47,9 \pm 0,35^{***}$
Trajanje paketića akcionih potencijala (s)	$2,44 \pm 0,09$	$2,66 \pm 0,1^{***}$
Trajanje intervala između paketića (s)	$4,61 \pm 0,28$	$2,86 \pm 0,15^{***}$
Amplituda hiperpolarizacije (mV)	$8,69 \pm 0,39$	$5,98 \pm 0,31^{***}$
Frekvencija akcionih potencijala (Hz)	$1,11 \pm 0,05$	$1,43 \pm 0,08^*$

Vrednosti bioelektričnih parametara Br neurona u kontrolnom periodu i 4. min perfuzije ouabaina. * $p=0,024$, *** $p<0,001$ označavaju statistički značajne promene u merenim parametrima (*t-test* za zavisne uzorke, *Wilcoxon test*). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška i dobijeni su iz 7 nezavisnih eksperimenata.

Jedan period oscilacija membranskog potencijala čini paketić i interval između paketića akcionih potencijala. Uočene promene u trajanju paketića akcionih potencijala i intervala između paketića akcionih potencijala ukazivale su na značajnu ulogu Na^+/K^+ pumpa u regulaciji oscilacija membranskog potencijala Br neurona. Nakon blokiranja

pumpe ouabainom, u odnosu na kontrolnu vrednost od $7,035 \pm 0,34$ s, period oscilacija membranskog potencijala Br neurona bio je skraćen za 21,67%, do vrednosti od $5,51 \pm 0,24$ s (Slika 26, n=7). Uočeno skraćenje perioda oscilacija statistički je značajno.

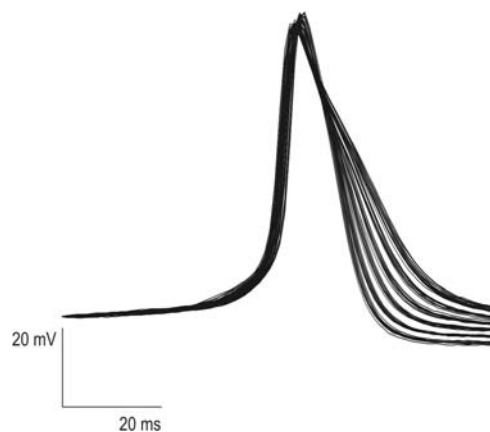


Slika 26. Promena perioda oscilacija potencijala membrane Br neurona nastala blokiranjem Na^+/K^+ pumpe. T1 označava trajanje perioda oscilacija u kontrolnom periodu, dok T2 označava trajanje perioda oscilacija u uslovima kada je pumpa blokirana ouabainom. Analizirana su po 70 perioda u kontrolnim uslovima i uslovima kada je pumpa blokirana ouabainom. Skraćenje perioda oscilacija izazvano ouabainom je statistički značajno, $***p < 0,001$, *t-test* za zavisne uzorke. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška i dobijeni su iz 7 nezavisnih eksperimenata.

Od posebnog interesa je bilo detaljnije ispitivanje promena unutar paketića akcionih potencijala u uslovima kada je Na^+/K^+ pumpa blokirana ouabainom, jer je u prvom nizu eksperimenata pokazano da magnetno polje od 10 mT dovodi do smanjenja trajanja akcionog potencijala Br neurona. Stoga je ispitana uloga Na^+/K^+ pumpe u regulaciji trajanja akcionog potencijala i *ISI* unutar paketića akcionih potencijala Br neurona.

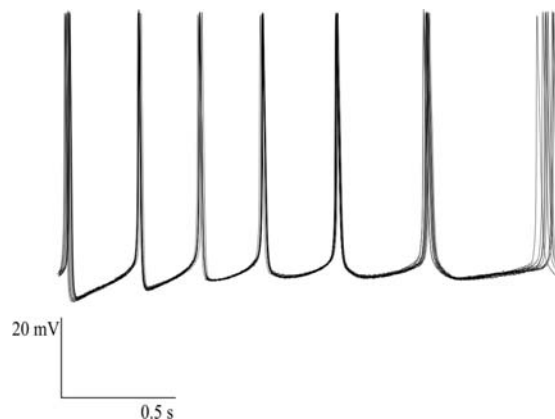
Ritmično stvaranje akcionih potencijala Br neurona odlikuje određena pravilnost. Naime, kroz jedan paket trajanje akcionih potencijala se progresivno

povećava tako da je prvi akcioni potencijal najkraći, a poslednji u paketiću ima najduže trajanje, (Slika 27).



Slika 27. Prikaz poravnatih zapisa akcionih potencijala iz 10 paketića. Zapisi su poravnati u odnosu na početak uzlazne faze akcionog potencijala. Varijacije u trajanju akcionih potencijala između paketića akcionih potencijala Br neurona su veoma male.

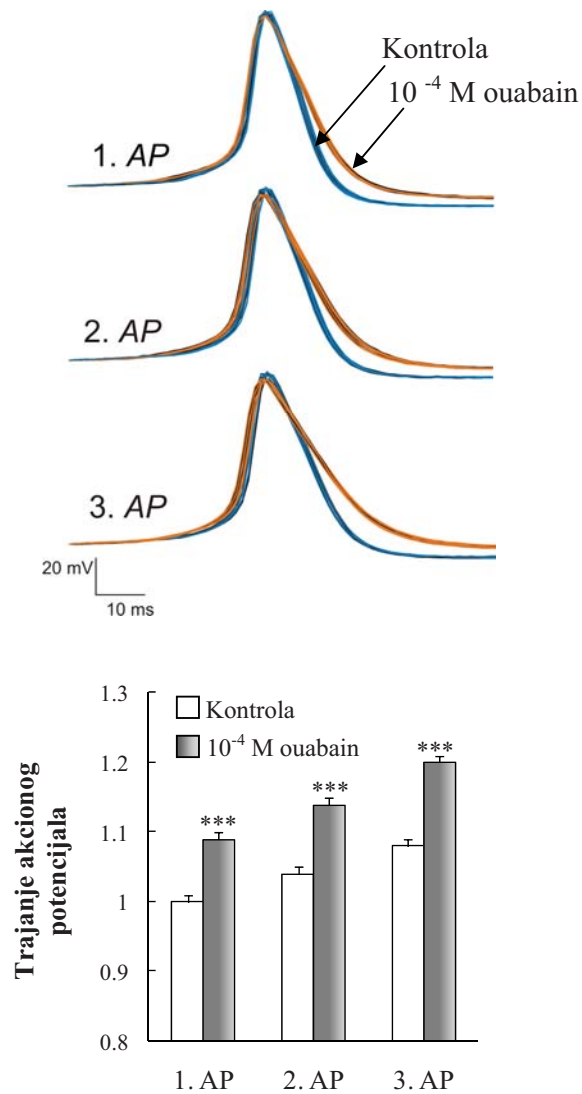
Takođe, kroz paketić, trajanje *ISI* se postepeno smanjuje od početka ka sredini paketića, a zatim se od sredine do kraja paketića postepeno povećava (Slika 28).



Slika 28. Prikaz poravnatih zapisa intervala između akcionih potencijala (*ISI*) iz 10 paketića. Zapisi su poravnati u odnosu na početak uzlazne faze akcionog potencijala. Sem za poslednji *ISI* u paketiću, varijacije u trajanju *ISI* između paketića su veoma male.

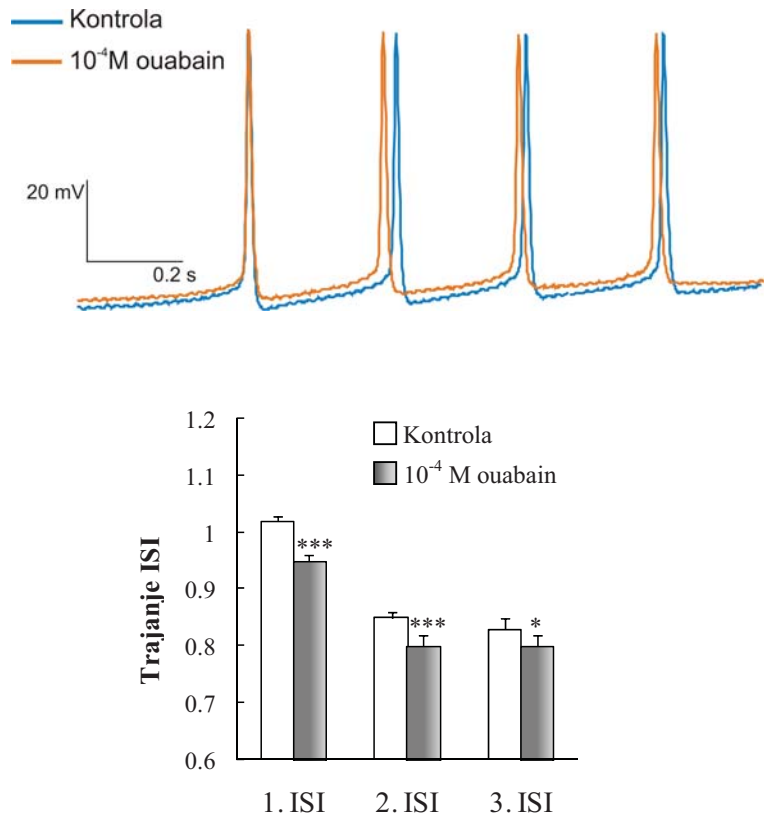
Imajući u vidu ovu pravilnost koja odlikuje spontani bioelektrični ritam Br neurona, ispitan je uticaj ouabaina na trajanje akcionih potencijala i *ISI* uzetih sa istih pozicija u paketiću u kontroli odnosno u ouabainu. Analizirana su prva tri akciona potencijala i *ISI*.

U odnosu na kontrolne vrednosti od $1 \pm 0,01$, $1,04 \pm 0,01$ i $1,08 \pm 0,01$, trajanje prva tri akciona potencijala u paketićima Br neurona ($n=7$) povećala su se do vrednosti od $1,09 \pm 0,01$, $1,14 \pm 0,01$ i $1,2 \pm 0,01$ u ouabainu. Izmerene promene u trajanju akcionog potencijala koje su nastale nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu su statistički značajne (Slika 29).



Slika 29. Promene trajanja akcionog potencijala (AP) Br neurona ($n=7$) nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe. Na svakoj poziciji ouabain je izazvao statistički značajno širenje akcionog potencijala (***) $p < 0,001$, *t-test* za zavisne uzorke). Prikazani su poravnati zapisi prva tri akciona potencijala iz 10 paketića u kontroli i ouabainu, analizirano je po 70 akcionih potencijala na svakoj poziciji. Trajanja su normalizovana na trajanje prvog akcionog potencijala u svakom eksperimentu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Dalja ispitivanja pokazala su da se trajanja prva tri *ISI* u paketiću skraćuju nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe ouabainom u Br neuronu (Slika 30). U odnosu na kontrolne vrednosti od $1,02 \pm 0,01$, $0,85 \pm 0,01$ i $0,83 \pm 0,02$, trajanja *ISI* Br neurona su se skratila do vrednosti od $0,95 \pm 0,01$, $0,8 \pm 0,02$ i $0,8 \pm 0,02$ u ouabainu. Izmerene promene u trajanju *ISI* koje su nastale nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu su statistički značajne ($n=7$).

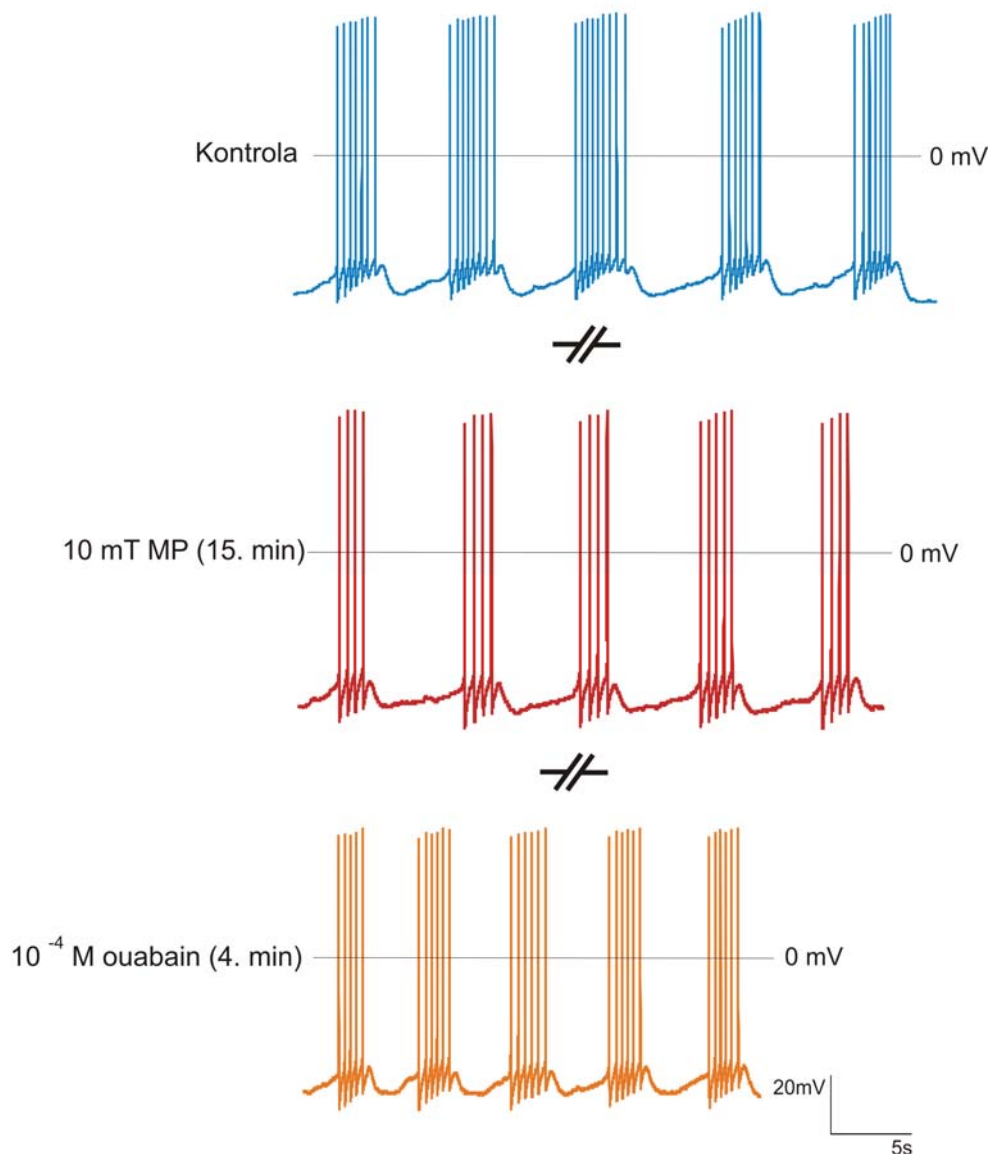


Slika 30. Promene trajanja intervala između akcionih potencijala (*ISI*) u paketiću nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu ($n=7$). Na svakoj poziciji ouabain je izazvao statistički značajno skraćenje *ISI* (* $p=0,011$ i *** $p<0,001$, *Wilcoxon* test). Prikazani su poravnati zapisi prva tri *ISI* iz 10 paketića akcionih potencijala Br neurona u kontroli i ouabainu. Analizirano je po 60 *ISI*-a na svakoj poziciji, u kontrolnim uslovima i u uslovima kada je pumpa blokirana ouabainom. Trajanja su normalizovana na trajanje prvog *ISI* u svakom eksperimentu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Aktivnost Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu izloženom magnetnom polju jačine 10 mT

Promene bioelektričnih parametara nastale nakon dodavanja ouabaina pokazale su da aktivnost Na^+/K^+ pumpe ima važnu ulogu u regulaciji spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona. Stoga je u narednom nizu eksperimenata ispitivana aktivnost

pumpe u Br neuronima koji su izloženi magnetnom polju od 10 *mT*. Neuron je prvo izložen magnetnom polju, a potom je Na⁺/K⁺ pumpa blokirana ouabainom. Na Slici 31 su prikazane promene spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona u magnetnom polju od 10 *mT* i nakon blokiranja Na⁺/K⁺ pumpe ouabainom. Magnetno polje je hiperpolarisalo maksimalnu vrednost potencijala mirovanja membrane, smanjilo trajanja paketića i smanjilo frekvenciju akcionih potencijala Br neurona (n=7). Izmerene promene su statistički značajne. Trajanja intervala između paketića akcionih potencijala i amplituda hiperpolarizacije se nisu značajno promenile u magnetnom polju od 10 *mT*.



Slika 31. Intracelularno registrovana aktivnost Br neurona u kontrolnim uslovima, u 10 mT magnetnom polju (MP) i 4 minuta nakon perfuzije 10⁻⁴ M ouabaina.

Nakon izlaganja magnetnom polju ouabain je depolarisao maksimalnu vrednost potencijala mirovanja membrane, povećao trajanje paketića, smanjio trajanje intervala između paketića akcionih potencijala, redukovao amplitudu hiperpolarizacije i povećao frekvenciju akcionih potencijala Br neurona (n=7), slično kao kod kontrolnih Br neurona. Uočene promene su statistički značajne u poređenju sa vrednostima izmerenim u magnetnom polju od 10 mT. Vrednosti svih izmerenih bioelektričnih parametara Br neurona u kontrolnom periodu, magnetnom polju od 10 mT i u ouabainu (n=7) date su u Tabeli 7.

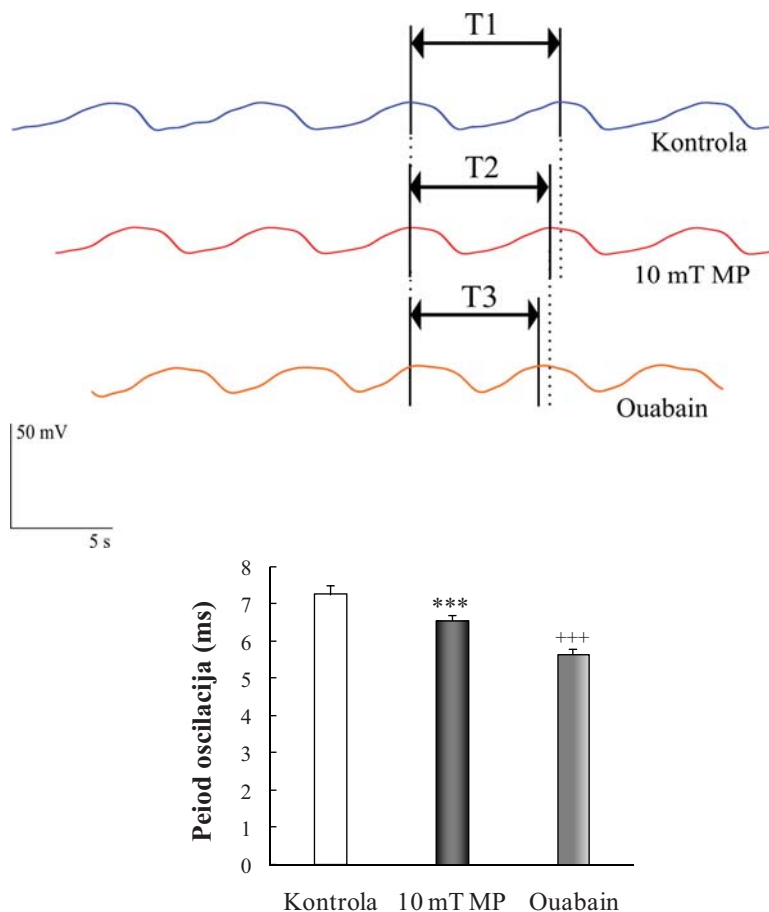
Tabela 7. Efekti magnetnog polja jačine 10 mT i ouabaina na spontanu bioelektričnu aktivnost Br neurona

Bioelektrična aktivnost Br neurona	Kontrola	10 mT MP	Ouabain
Vmax (mV)	50,8±0,24	55,6±0,28***	49,8±0,49 ⁺⁺⁺
Trajanje paketića akcionih potencijala (s)	3,12±0,12	2,4±0,06***	2,76±0,12 ⁺
Trajanje intervala između paketića (s)	4,2±0,18	4,2±0,18	3±0,06 ⁺⁺⁺
Amplituda hiperpolarizacije (mV)	10,1±0,3	10,4±0,3	6,4±0,2 ⁺⁺⁺
Frekvencija akcionih potencijala (Hz)	1,34±0,13	1,05±0,11*	1,33±0,15 ⁺

Vrednosti bioelektričnih parametara Br neurona izmerenih u kontrolnim uslovima, u magnetnom polju od 10 mT (MP) i 4. min perfuzije ouabaina. *p=0,011, ***p<0,001 označavaju statistički značajne razlike između kontrole i MP od 10 mT (*Wilcoxon* test, *t*-test za zavisne uzorke). ⁺p=0,01, ⁺⁺⁺p<0,001 označava statistički značajne razlike između MP od 10 mT i ouabaina (*Wilcoxon* test, *t*-test za zavisne uzorke). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška i dobijeni su iz 7 nezavisnih eksperimenata.

Ispitujući dalje bioelektričnu aktivnost Br neurona, izmereni su periodi oscilacija potencijala membrane u kontrolnim uslovima, magnetnom polju od 10 mT i ouabainu (n=7). U odnosu na kontrolnu vrednost od 7,28±0,23 s, magnetno polje od 10 mT dovelo je do skraćanja perioda oscilacija potencijala membrane Br neurona za 9,61%, do vrednosti od 6,58±0,13 s (Slika 32, T1 i T2 periodi). Smanjenje perioda oscilacija uočeno je i kada je nakon izlaganja magnetnom polju, blokirana Na⁺/K⁺ pumpa u Br

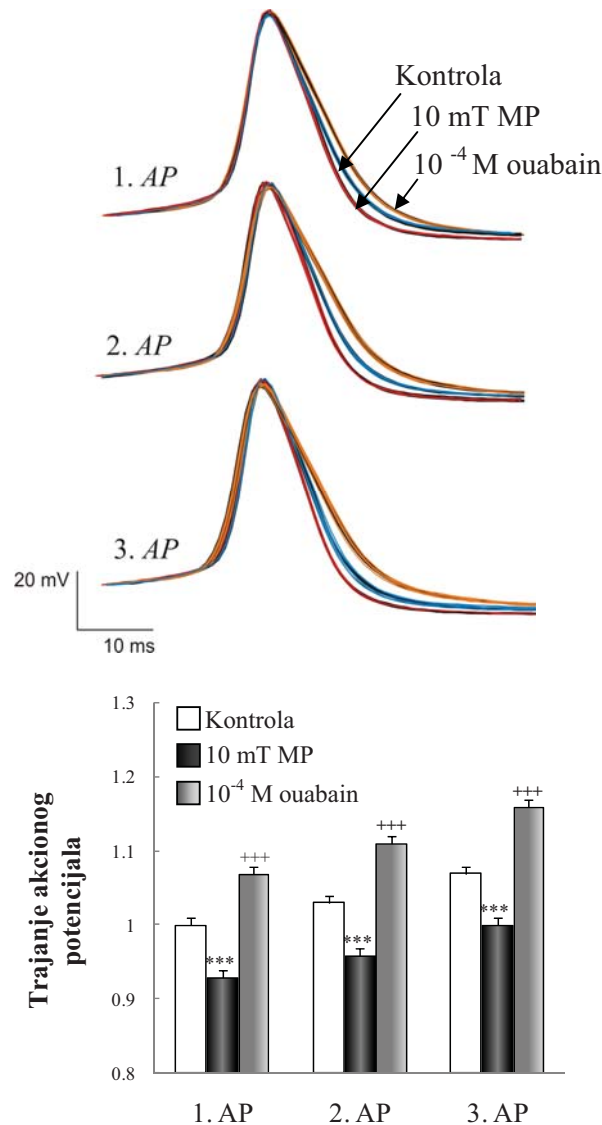
neuronu. U takvim uslovima, blokiranje Na^+/K^+ pumpe, skratilo je period oscilacija Br neurona za 13,92%, do vrednosti od $5,66 \pm 0,15$ s. Ova promena je značajna u poređenju sa vrednošću perioda oscilacija Br neurona u magnetnom polju od 10 mT (Slika 32, T2 i T3 periodi).



Slika 32. Promene perioda oscilacija potencijala membrane Br neurona ($n=7$) nastale u magnetnom polju od 10 mT (MP) i nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe. T1 označava trajanje perioda oscilacija u kontrolnom periodu, T2 u 10 mT magnetnom polju i T3 u ouabainu. Analizirana su po 70 perioda u kontrolnim uslovima, u uslovima izlaganja MP-u i uslovima kada je pumpa blokirana ouabinom. Magnetno polje od 10 mT je statistički značajno skratilo period oscilacija membranskog potencijala (***) $p < 0,001$, t -test za zavisne uzorke, označava poređenje perioda oscilacija između između kontrole i magnetnog polja od 10 mT). Nakon izlaganja magnetnom polju ouabain je izazvao statistički značajno skraćanje perioda oscilacija (+++) $p < 0,001$, t -test za zavisne uzorke, označava poređenja trajanja perioda oscilacija između između 10 mT magnetnog polja i ouabaina). Podaci su predstavljeni su kao srednja vrednost \pm standardna greška.

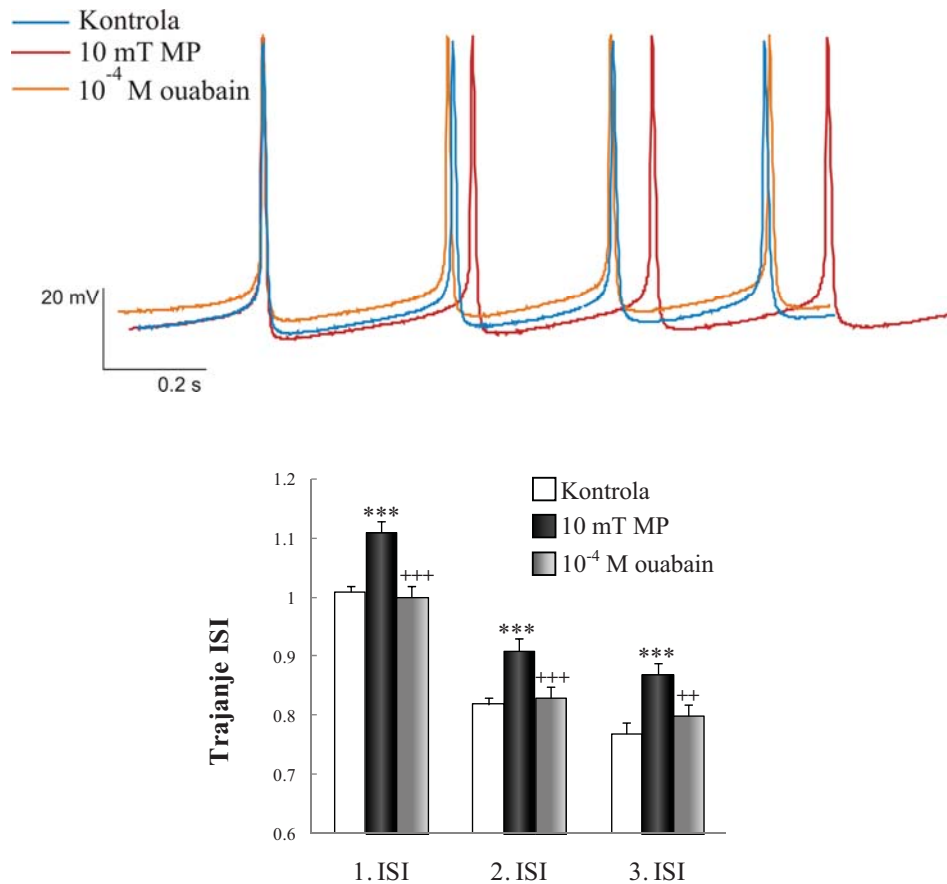
Naročito je bilo važno ispitati efekat ouabaina na trajanje prva tri akciona potencijala i ISI Br neurona koji su izlagani magnetnom polju od 10 mT ($n=7$). Nakon smanjenja trajanja prva tri akciona potencijala Br neurona u magnetnom polju od 10 mT, blokiranje Na^+/K^+ pumpe ouabainom dovelo je do njihovog širenja. Obe promene u

trajanjima akcionih potencijala su statistički značajne (Slika 33). Trajanja prva tri akciona potencijala u kontrolnim uslovima imaju vrednost od $1 \pm 0,01$, $1,03 \pm 0,01$ i $1,07 \pm 0,01$, u 10 mT magnetnom polju vrednost od $0,93 \pm 0,01$, $0,96 \pm 0,01$ i $1 \pm 0,01$ i u ouabainu vrednost od $1,07 \pm 0,01$, $1,11 \pm 0,01$, i $1,16 \pm 0,01$.



Slika 33. Promene trajanja akcionog potencijala (AP) nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu ($n=7$) koji je izložen 10 mT magnetnom polju (MP). Prikazani su poravnati zapisi prva tri akciona potencijala iz 10 paketića u kontroli, u 10 mT MP i u ouabainu. Na svakoj poziciji izlaganje MP je skratilo trajanje akcionog potencijala, nakon čega je ouabain izazvao širenje akcionog potencijala. Analizirano je po 70 akcionih potencijala na svakoj poziciji i u svakom od eksperimentalnih uslova. Promene su statistički značajne (** $p < 0,001$ -označava poređenja između kontrole i 10 mT MP, dok +++ $p < 0,001$ označava poređenja trajanja akcionih potencijala između 10 mT MP i ouabaina, t -test za zavisne uzorke). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. Trajanja su normalizovana na trajanje prvog akcionog potencijala u svakom eksperimentu.

U odnosu na kontrolne vrednosti od $1,01 \pm 0,01$, $0,82 \pm 0,01$ i $0,77 \pm 0,02$, magnetno polje od 10 mT dovelo je do povećanja trajanje prva tri *ISI* Br neurona do vrednosti od $1,11 \pm 0,02$, $0,91 \pm 0,02$ i $0,87 \pm 0,02$. Na svakom položaju promene su statistički značajne. Kada je nakon izlaganja magnetnom polju blokirana Na^+/K^+ pumpa u Br neuronu, došlo je do skraćivanja *ISI* do vrednosti od $1 \pm 0,02$, $0,83 \pm 0,02$ i $0,8 \pm 0,02$. Promene su statistički značajne u poređenju sa vrednostima trajanja *ISI* u magnetnom polju. Opisane promene u trajanju *ISI* Br neurona u magnetnom polju od 10 mT i u ouabainu, prikazane su na (Slici 34, $n=7$).



Slika 34. Promene trajanja intervala između akcionih potencijala (*ISI*) nakon blokiranja Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu koji je izložen 10 mT magnetnom polju (MP). Prikazani su poravnati zapisi prva tri *ISI* u kontroli, u 10 mT MP i u ouabainu. Na svakoj poziciji izlaganje MP je povećalo trajanje *ISI*, nakon čega je ouabain skratio trajanje *ISI*. Promene su statistički značajne (***) $p < 0,001$ -označava poređenja trajanja *ISI* između kontrole i 10 mT MP, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ označava poređenja trajanja *ISI* između 10 mT MP i ouabaina, $n=7$, *t-test* za zavisne uzorke). Analizirano je po 60 *ISI* na svakoj poziciji i u svakom od eksperimentalnih uslova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. Trajanja su normalizovana na trajanje prvog *ISI* u svakom eksperimentu.

Promene ispitivanih bioelektričnih parametara pokazuju da magnetno polje jačine 10 mT i ouabain modulišu spontanu aktivnost Br neurona. Posmatrajući period oscilacija u kontrolnim i Br neuronima izlaganim magnetnom polju od 10 mT, može se ustanoviti da ouabain i magnetno polje, iako dovode do različitih promena u bioelektričnoj aktivnosti Br neurona, dovode do skraćanja perioda oscilacija membranskog potencijala. Magnetno polje je promenilo period oscilacija membranskog potencijala Br neurona skraćujući trajanje paketića akcionih potencijala. Sa druge strane, ouabain je uticao na period oscilacija Br neurona povećavajući trajanja paketića i prevashodno skraćujući interval između paketića akcionih potencijala. Ouabain je depolarisao membranu Br neurona za 3 mV u kontrolnim uslovima i za 5,8 mV nakon izlaganja Br neurona magnetnom polju od 10 mT. Ouabain je statistički značajno povećao trajanje prva tri akciona potencijala u kontrolnim neuronima za 9%, 9,61%, 11,11%, odnosno za 15,05%, 15,62%, 16% u Br neuronima koji su izloženi magnetnom polju od 10 mT. Slično, ouabain je statistički značajno smanjio trajanje prva tri ISI za 6,86%, 5,88%, 3,61% u kontrolnim neuronima i za 9,91%, 8,79%, 8,04 % u Br neuronima koji su izloženi magnetnom polju od 10 mT. Promene pomenutih bioelektričnih parametara Br neurona koje su nastale nakon dodavanja ouabaina bile su značajno veće u uslovima izlaganja magnetnom polju od 10 mT (Tabela 8).

Tabela 8. Efekat ouabaina na spontanu bioelektričnu aktivnost kontrolnih i Br neurona izlaganih magnetnom polju jačine 10 mT

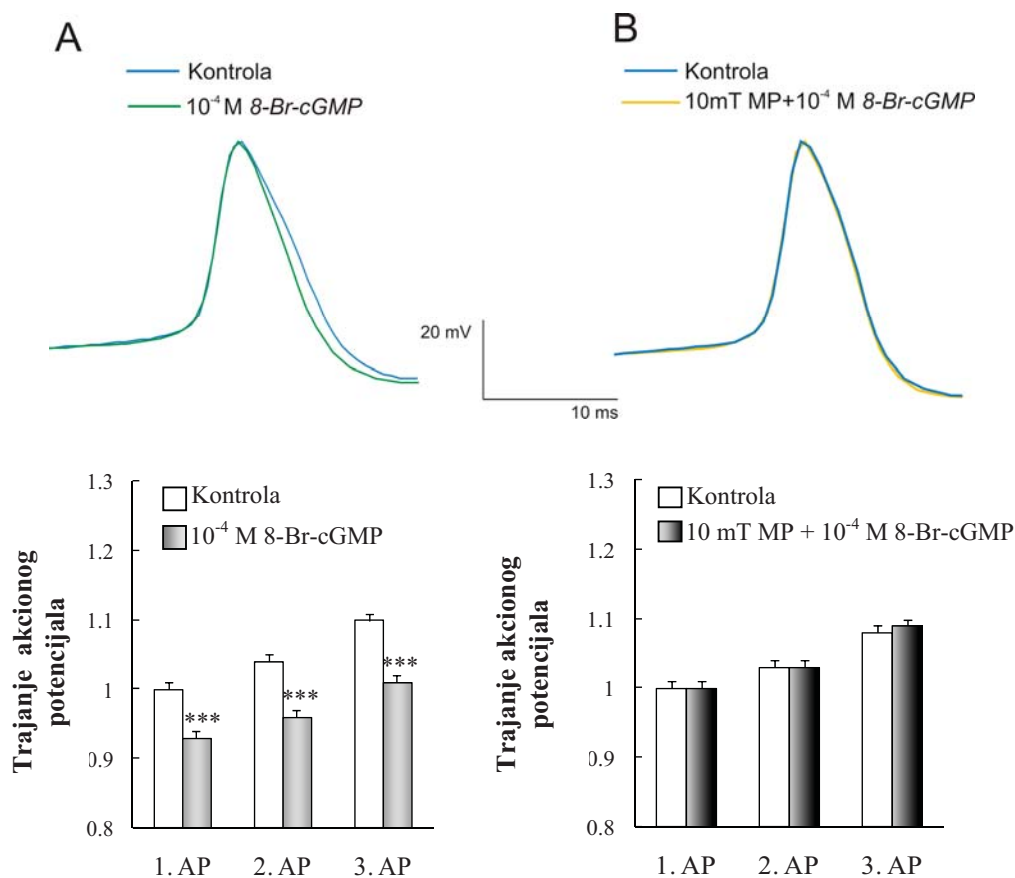
Efekat ouabaina	Kontrolni Br neuron	Br neuron izlagan magnetnom polju jačine 10 mT
Depolarizacija R _{pmax} (mV)	3±0,15	5,8±0,38 †††
Širenje akcionog potencijala		
1. akcioni potencijal	0,09±0,01	0,14±0,01 †††
2. akcioni potencijal	0,11±0,01	0,15±0,01 ††
3. akcioni potencijal	0,12±0,01	0,17±0,01 ††
Skraćenje ISI		
1. ISI	0,07±0,01	0,11±0,01 †
2. ISI	0,05±0,01	0,09±0,01
3. ISI	0,03±0,01	0,06±0,02

Promene bioelektričnih parametara izazvane ouabainom u kontrolnim Br neuronima (n=7) i Br neuronima izlaganim magnetnom polju od 10 mT (n=7). †p=0,025 (Mann Whitney test), ††p<0,01, †††p<0,001 (t-test) označavaju statistički značajne razlike između efekata ouabaina u kontrolnim uslovima i nakon izlaganja Br neurona magnetnom polju od 10 mT.

Takvi podaci pokazuju da je u Br neuronu koji je izlagan magnetnom polju jačine 10 mT , aktivnost Na^+/K^+ pumpe povećana.

UTICAJ 8-Br-cGMP-A NA TRAJANJE AKCIONOG POTENCIJALA BR NEURONA

Biohemijska analiza pokazala je da je aktivnost Na^+/K^+ pumpe između kontrolnih i okoloždrelnih ganglijskih kompleksa izloženih magnetnom polju od 10 mT značajno različita nakon aktivacije signalnih puteva regulisanih protein kinazom G (Slika 22). Stoga je u narednim eksperimentima ispitan uticaj δ -Br-cGMP-a na trajanje akcionog potencijala Br neurona u kontrolnim uslovima i tokom izlaganja magnetnom polju od 10 mT (Slika 35).



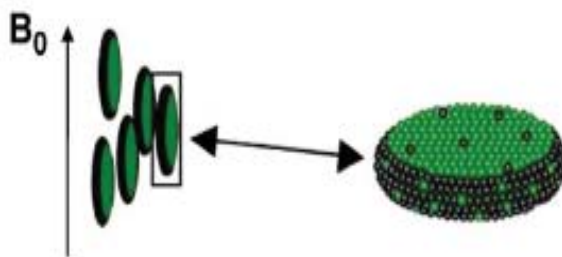
Slika 35. Efekat 8-Br-cGMP-a na trajanje akcionog potencijala Br neurona. A. Aplikacija 8-Br-cGMP-a dovela je do smanjenje trajanja prva tri akciona potencijala. Promene su statistički značajne (***) $p < 0,001$, $n=4$, t -test za zavisne uzorke). Prikazani su poravnati zapisi akcionih potencijala u kontroli i 15. min dodavanja 8-Br-cGMP-a. B. Dodavanje 8-Br-cGMP-a uz istovremeno izlaganje magnetnom polju od 10 mT (10 mT MP+8-Br-cGMP) nije statistički značajno promenilo trajanje prva tri akciona potencijala (1.AP - $p=0,185$; 2.AP - $p=0,96$; 3.AP - $p=0,186$, $n=4$, t -test za zavisne uzorke). Prikazani su poravnati zapisi akcionih potencijala u kontroli i u 15. min eksperimentalnih uslova 10 mT MP+8-Br-cGMP. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. Trajanja su normalizovana na trajanje prvog akcionog potencijala u svakom eksperimentu.

U odnosu na vrednosti u kontrolnim uslovima od $1\pm 0,01$, $1,04\pm 0,01$ i $1,1\pm 0,01$, dodavanje *8-Br-cGMP*-a značajno je smanjilo trajanja prva tri akciona potencijala Br neurona do vrednosti od $0,93\pm 0,01$, $0,96\pm 0,01$ i $1,01\pm 0,01$, za 7%, 7,69% and 8,18% (Slika 35A, n=4). Ovi podaci pokazuju da *8-Br-cGMP* ima isti efekat na trajanje akcionog potencijala Br neurona kao i magnetno polje od 10 mT. Stoga je u sledećim eksperimentima ispitan uticaj *8-Br-cGMP*-a na trajanje akcionog potencijala uz istovremeno izlaganje Br neurona magnetnom polju od 10 mT. Sa Slike 35B se može videti da se u takvim eksperimentalnim uslovima trajanja prva tri akcionih potencijala Br neurona (n=4) čije su vrednosti $1\pm 0,01$, $1,03\pm 0,01$ i $1,09\pm 0,01$, nisu promenila u odnosu na vrednosti u kontrolnim uslovima od $1\pm 0,01$, $1,03\pm 0,01$ i $1,08\pm 0,01$. Ovakvi podaci ukazuju da se metabolički putevi delovanja magnetnog polja i *cGMP*-a na trajanje akcionog potencijala Br neurona ukrštaju.

DISKUSIJA

PUTEVI DELOVANJA UMERENO JAKOG STATIČKOG MAGNETNOG POLJA

Pregled mogućih mehanizama dejstva umereno jakog magnetnog polja na nervni sistem beskičmenjaka i kičmenjaka dat je u studiji *Balabana i saradnika (1990)*. Magnetno polje bi moglo direktno uticati na osobine jonskih kanala u membrani ćelija. Pod uticajem magnetnog polja moglo bi doći do promene konformacije proteina koji grade jonske kanale što bi dovelo do promene u aktivnosti kanala i bioelektričnih osobina ćelija. Međutim, ovaj predloženi mehanizam delovanja magnetnog polja je manje verovatan s obzirom da promene bioelektričnih parametara nervnih ćelija nisu vidljive odmah po početku izlaganja magnetnom polju, već za izvesnim kašnjenjem od nekoliko minuta (*Rosen 2003a*). Umereno jako statičko magnetno polje bi moglo da utiče i na brzinu hemijskih reakcija u nervnom sistemu (*Steiner i Ulrich 1989, Rosen 2003a*). Naime, u mnogim reakcijama se formiraju slobodni radikali sa nesparenim elektronima čiji se spinovi u prisustvu spoljašnjeg magnetnog polja orijentišu paralelno linijama polja. Trenutno se smatra da se pomoću ovog mehanizma migratorne vrste orijentišu prema magnetnom polju Zemlje. Najčešće prihvaćeno objašnjenje u literaturi je da umereno jako statičko magnetno polje ostvaruju svoje dejstvo na nervni sistem menjajući strukturu membrane (*Rosen 2003a, Petrov i Martinac 2007*). Ova hipoteza počiva na rezultatima istraživanja koja su pokazala da se fosfolipidne vezikule u prisustvu magnetnog polja jačine veće od jedan T , orijentišu paralelno linijama polja (Slika 36).

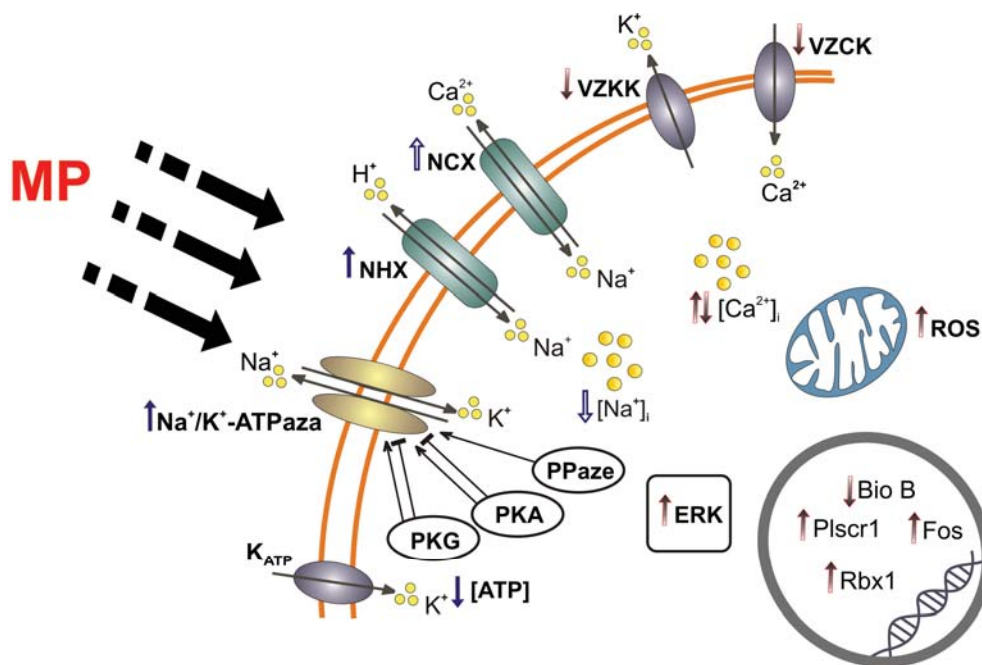


Slika 36. Orijentacija fosfolipidnih vezikula (bicela) paralelno linijama spoljašnjeg magnetnog polja- B_0 , preuzeto iz *Warschawski i saradnici 2011*.

Dodatno ovu teoriju podržavaju i istraživanja u kojima je pokazano da i umereno jako statičko magnetno polje od svega 200 *mT*, takođe utiču na strukturu fosfolipidnih vezikula (*Braganza i saradnici 1987*). Ukoliko bi magnetno polje promenilo strukturu membrane, takve promene bi potom mogle izmeniti osobine jonskih kanala što bi vodilo ka promeni bioelektrične aktivnosti nervnih ćelija koje bi bile vidljive sa izvesnim kašnjenjem a i po završetku izlaganja magnetnog polju. Potvrda ove hipoteze može se naći u istraživanjima uticaja magnetnog polja na osobine voltažno zavisnih Ca^{2+} i Na^{+} kanala, u kojima je pokazano da umereno jako magnetno polje utiče na kinetiku aktivacije ovih kanala za koju se pretpostavlja da je regulisana transmembranskim segmentom proteina kanala (*Rosen 1996, Rosen 2003b*). U drugoj studiji pokazano je da umereno jako magnetno polje (~400 *mT*) utiče na gadolinijumom izazvanu inhibiciju bakterijskih mehanosenzitivnih kanala rekonstituisanih u fosfolipidnom dvosloju (*Petrov i Martinac 2007*). Ispitivanja na fosfolipidnim membranama pokazala su da vezivanje gadolinijuma dovodi do povećanja kapacitivnih svojstava membrane (*Ermakov i saradnici 2001*), te se može pretpostaviti da gadolinijum inhibira mehanosenzitivne kanale menjajući mehaničke osobine fosfolipidnog dvosloja koji okružuje kanal. Pri izlaganju magnetnom polju inhibicija aktivnosti kanala gadolinijumom je bila izraženija, što je ukazivalo da magnetno polje prvenstveno utiče na stukturu fosfolipidnog dvosloja.

Dosadašnja istraživanja otkrila su da kratkotrajno izlaganje umereno jakim statičkom magnetnom polju utiče na različite ćelijske elemente (Slika 37). Pronađeno je da magnetno polje (~120 *mT*) inaktivira voltažno zavisne kalijumove kanale neurona u korenu trigeminalne ganglije pacova (VZKK, *Jie-Fei i saradnici 2007*) i voltažno zavisne kalcijumove kanale u liniji *GH3* ćelija (VZCK, *Rosen 1996*). Podaci iz literature pokazali su da magnetno polje (~750 *mT*) dovodi do povećanja intracelularne koncentracije Ca^{2+} u kortikalnim neuronima pacova u kulturi (*Prina-Mello i saradnici 2006*). Suprotno tome, magnetno polje (~250 *mT*) dovelo je do smanjenja intracelularne koncentracije Ca^{2+} u PC12 ćelijskoj liniji pacova (*Wang i saradnici 2010*). U endotelijalnim ćelijama čoveka magnetno polje (750 *mT*) aktivira *ERK* signalni put (*Prina-Mello i saradnici 2006*). Magnetno polje (300 *mT*) dovodi do promena i u mitohondrijalnoj DNK i povećava količine slobodno-radikalnih kiseoničnih vrsta (ROS, akronim od "reactive oxidative species") u mitohondrijama endotelijalnih ćelija

čoveka (*Potenza i saradnici 2010*). Pokazano je da magnetno polje utiče i na ekspresiju gena uključenih u regulaciju ćelijskog metabolizma- Fos, Rbx1, BioB gena, kao i gena odgovornih za oštećenja ćelijske membrane- Plscr 1 gen (*Wang i saradnici 2009, Polidori i saradnici 2012*).



Slika 37. Prikaz promena u ćeliji pri kratkotrajnom izlaganju umereno jakim statičkim magnetnim poljima (MP). Crvene strelice označavaju promene koje su poznate iz literature, plave strelice označavaju promene koje su uočene u našim istraživanjima, dok bele označavaju promene u ćeliji koje su se mogle dogoditi na osnovu rezultata naših istraživanja. Magnetno polje je povećalo aktivnost Na^+/K^+ pumpe, što dovodi do smanjenje $[\text{Na}^+]_i$. Promena $[\text{Na}^+]_i$ povećava aktivnost Na^+/H^+ izmenjivača (NHX) i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivača (NCX). Posledica povećanja aktivnosti NHX je smanjenje količine H^+ u ćeliji. Moguće je da povećana aktivnost NCX smanjuje $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Usled povećane aktivnosti Na^+/K^+ pumpe dolazi do smanjenje ATP -a u ćeliji, što bi moglo da utiče na K_{ATP} kanale (*Grover i Garlid 2000*). Aktivnost Na^+/K^+ pumpe regulisana je protein fosfatazama (PPaze) i protein kinazama A i G (*Ramnanan i Storey 2006*). Poznato je da magnetno polje utiče na ekspresiju gena uključenih u regulaciju ćelijskog metabolizma (Fos, Rbx1, BioB geni), gena odgovornih za oštećenja ćelijske membrane (Plscr 1 gen), *Wang i sar. 2009, Polidori i sar. 2012*, magnetno polje dovodi do promena u mitohondrijalnoj DNK i povećava količine slobodno-radikalnih kiseoničnih vrsta- ROS (*Potenza i sar. 2010*), aktivira ERK signalni put (*Prina-Mello i sar. 2006*), inaktivira voltažno zavisne kalijumove kanale (VZKK, *Jie-Fei i sar. 2007*), voltažno zavisne kalcijumove kanale (VZCK, *Rosen 1996*), povećava i smanjuje koncentraciju Ca^{2+} (*Prina-Mello i sar. 2006, Wang i sar. 2010*).

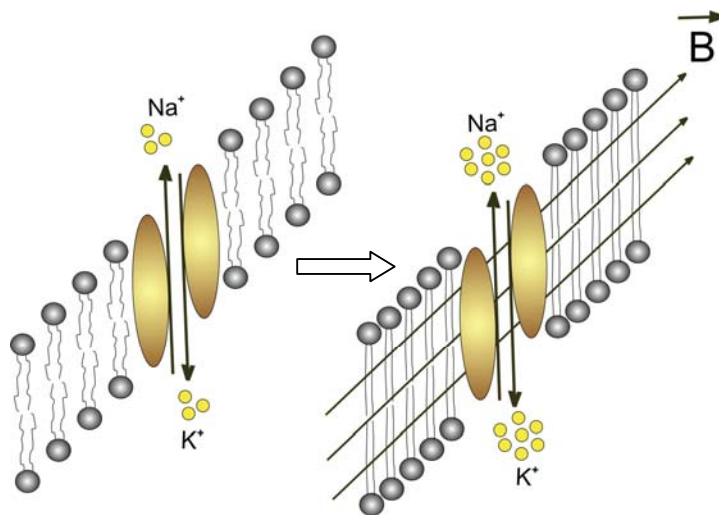
Naša istraživanja su pokazala da magnetno polje jačine 10 mT dovodi do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža. Povećana aktivnost Na^+/K^+ pumpe, posredstvom promena u gradijentu Na^+ jona, utiče na povećanje aktivnosti Na^+/H^+ izmenjivača i povećanje pH_i (Slika 37). Rezultati naših istraživanja pokazuju i da procesi fosforilacije i defosforilacije doprinose povećanju aktivnosti

Na⁺/K⁺ pumpe, jer se nakon blokiranja ovih procesa više ne uočava značajna promena u aktivnosti pumpe pod dejstvom magnetnog polja (Slika 22, BFD uslovi). Biohemijske analize (Slika 22) i elektrofiziološki eksperimenti na Br neuronu (Slika 35) pokazali su da se putevi delovanja magnetnog polja i signalnih puteva regulisanih sekundarnim glasnikom *cGMP*-om ukrštaju. Preplitanja ovih puteva mogla su se odigrati na različitim nivoima. Na primer, signalni putevi regulisani protein kinazom G mogu dovesti do direktne fosforilacije Na⁺/K⁺ pumpe i na taj način blokirati uticaj magnetnog polja na pumpu. Značajnu ulogu u preplitanju puteva delovanja magnetnog polja i signalnih puteva regulisanih *cGMP*-om može imati i Ca²⁺ koji moduliše aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe (Yingst 1988). Podaci iz literature pokazuju da *cGMP* može imati kako stimulatoran tako i inhibitoran efekat na struje nošene Ca²⁺. Povećanje Ca²⁺ struja u prisustvu *cGMP*-a zapaženo je u neuronima puža *H. pomatia* (Paupardin-Tritsch i saradnici 1986, Zsombok i saradnici 2005). Sa druge strane smanjenje Ca²⁺ struja u prisustvu *cGMP*-a zapaženo je kod R15 neurona *Aplysie* (Levitan i Levitan 1988), srčanim ćelijama embriona pileta (Wahler i saradnici 1990) i ćelijama srca zeca (Tohse i saradnici 1995).

Teško je utvrditi primarno mesto delovanja umereno jakog magnetnog polja i otkriti kroz koje sve signalne puteve magnetno polje ispoljava svoje dejstvo. Ukoliko bi Na⁺/K⁺ pumpa bila primarno mesto delovanja magnetnog polja, onda bi se promena u aktivnosti pumpe mogla povezati sa ostalim efektima umereno jakog magnetnog polja poznatim iz literature koji su predstavljeni na Slici 37. Naime, preko *Src* kinaze, Na⁺/K⁺ pumpa interaguje sa receptorom epidermalnog faktora rasta (*EGFR*) i povećava aktivnost *Ras* proteina što bi moglo dovesti do stvaranja slobodnih radikalskih kiseoničnih vrsta u mitohondrijama (Kominato i saradnici 2008, Reinhard i saradnici 2012). Promena u aktivnosti pumpe bi mogla posredstvom *Ras* proteina aktivirati i *ERK* signalni put koji je važan za regulaciju različitih procesa u ćelijskom metabolizmu (Reinhard i saradnici 2012). Pokazano je i da α subjedinica Na⁺/K⁺ pumpe direktno interaguje sa *IP3* receptorom na endoplazmatičnom retikulumu i da preko *Src* kinaze može dovesti do aktivacije ovog signalnog puta što bi uticalo na promenu koncentracije Ca²⁺ u ćeliji (Yuan i saradnici 2005, Zhang i saradnici 2006). Promena aktivnosti Na⁺/K⁺ pumpe mogla je imati uticaja i na aktivnost Na⁺/Ca²⁺ izmenjivača što bi takođe

izazvalo promenu koncentracije Ca^{2+} u ćeliji. Sve ove promene, kao i aktivacija različitih signalnih puteva mogli bi dovesti i do promene u ekspresiji gena u ćeliji.

Prema rezultatima biohemijskih analiza, blokiranje procesa fosforilacije i defosforilacije nije dovelo do potpunog gubitka efekta magnetnog polja jačine 10 mT na aktivnost Na^+/K^+ pumpe. Kao što se može videti sa Slike 22, u BFD eksperimentalnim uslovima, aktivnost Na^+/K^+ pumpe, mada ne značajno, je i dalje veća u magnetnom polju nego u kontrolnim uslovima. Kako su procesi fosforilacije i defosforilacije bili blokirani nakon izlaganja okoloždrelnih kompleksa magnetnom polju, može se pretpostaviti da su još neki putevi delovanja magnetnog polja uključeni u uočene promene aktivnosti Na^+/K^+ pumpe. Moguće je da je magnetno polje od 10 mT uticalo i na osobine membrana ćelija u nervnom sistemu puža koje su imale uticaja na aktivnost pumpe (Slika 38). Indikator takvih promena na membrani moglo bi biti malo smanjenje ^{31}P NMR PME signala koje je uočeno u nervnom sistemu puža nakon izlaganja magnetnom polju (Tabela 4), jer se promene u intenzitetu PME signala smatraju pokazateljem promena u integritetu membrana ćelija nervnog sistema (*Post i Kauer-Sant Amna 2011*). Pod dejstvom magnetnog polja, usled dijamagnetičnih osobina, fosfolipidni molekuli u membrani orijentišu se tako da im je duža osa normalna na linije magnetnog polja (Slika 38).



Slika 38. Mogući mehanizam delovanja magnetnog polja na strukturu membrane i aktivnost Na^+/K^+ pumpe. Fosfolipidni molekuli poseduju dijamagnetična svojstva i orijentišu se prema linijama magnetnog polja- B. U prisustvu magnetnog polja pokretljivost lanaca masnih kiselina u fosfolipidnim molekulima je smanjena, fosfolipidni molekuli postaju gušće raspoređeni usled čega i membrana postaje deblja što može dovesti do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ pumpe.

Ovakvim načinom orijentacije fosfolipidnih molekula, fosfolipidni dvosloj koji oni formiraju biva orijentisan paralelno linijama magnetnog polja. Opisani događaji mogu dovesti do gušćeg rasporeda fosfolipida u membrani usled čega membrana postaje deblja što bi moglo imati uticaja na aktivnost Na^+/K^+ pumpe. Naime, ispitivanja uticaja debljine fosfolipidnog sloja na aktivnost Na^+/K^+ pumpe, pokazala su da povećanje dužine lanaca masnih kiselina u fosfolipidnom sloju, kao i tretiranje *n-decanom* koji povećava debljinu dvosloja, dovode do povećanja aktivnosti pumpe (*Johannsson i saradnici 1981*). Ipak dodatni eksperimenti su neophodni za potvrdu ovakve pretpostavke.

PROMENA AKTIVNOSTI Na^+/K^+ PUMPE POD DEJSTVOM UMERENO JAKOG STATIČKOG MAGNETNOG POLJA

Spontana bioelektrična aktivnost Br neurona i nastanak akcionih potencijala u paketićima zahteva visoku aktivnost Na^+/K^+ pumpe. Promena ispitivanih bioelektričnih parametara Br neurona pod dejstvom magnetnog polja od 10 *mT*, naročito perioda oscilacija, potencijala mirovanja membrane i trajanja akcionih potencijala, ukazivala je na mogućnost delovanja magnetnog polja na aktivnost Br neurona posredstvom promena u aktivnosti Na^+/K^+ pumpe. Da bi se proverila ova pretpostavka, najpre je istražen uticaj magnetnog polja na aktivnost pumpe u okoloždrelnom ganglijskom kompleksu puža. Izlaganje magnetnom polju od 10 *mT* izazvalo je gotovo dvostruko povećanje aktivnosti Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža (Slika 22). Ovi rezultati u saglasnosti su na našim prethodnim istraživanjima koja se odnose na efekte promenljivog magnetnog polja na aktivnost Na^+/K^+ pumpe (*Nikolic i saradnici 2010*). Naime, izlaganje puževa promenljivom magnetnom polju jačine 0,5 *mT* i frekvencije 50 *Hz* u trajanju od 7 dana, dovelo je do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža. Povećanje aktivnosti Na^+/K^+ pumpe pod uticajem promenljivog magnetnog polja uočeno je i u vezikulama pripremljenim iz bubrega zeca (*Blank i Soo 1996*). Izlaganje vezikula promenljivom magnetnom polju različitih jačina u opsegu od 0 do 1 *mT* u trajanju od 40 *min*, pokazala su da je prag koji dovodi do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ pumpe između 0,2 i 0,3 μT . Slično, hronično izlaganje statičkom magnetnom polju jačine 20 *mT* povećavalo je aktivnost Na^+/K^+ pumpe u homogenatima pripremljenim iz mišića dijafragme pacova (*Itegin i saradnici 1995*). Opisani rezultati

pokazuju da je efekat promenljivih i statičkih magnetnih polja na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u suštini isti u različitim eksperimentalnim modelima kao što su puž, pacov ili zec. Logično je očekivati razlike u pragu jačine magnetnog polja koja dovodi do promena u aktivnosti pumpe kao i razlike u promenama aktivnosti pumpe uzrokovane magnetnim poljem, uzimajući u obzir postojanje tkivno specifičnih izoformi subjedinica pumpe i tkivno specifične mehanizme regulacije njene aktivnosti.

Detaljnije ispitivanje uticaja magnetnog polja od 10 mT na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža, pokazalo je da se uočeni efekat magnetnog polja na aktivnost pumpe u fiziološkim uslovima ne može uočiti nakon blokiranja procesa fosforilacije i defosforilacije (Slika 22). Dalja ispitivanja pokazala su da aktivacija signalnih puteva regulisanih protein kinazom G ili fosfatazama, poput magnetnog polja, povećavaju aktivnost Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža u kontrolnim uslovima. Pri tome, uočene razlike u povećanju aktivnosti pumpe mogu biti posledica interakcija između signalnih puteva regulisanih protein kinazama A i G, kao i fosfatazama. Signalni putevi regulisani protein kinazom G ne mogu biti direktno odgovorni za povećanje aktivnosti pumpe u magnetnom polju, jer je aktivacija ovih puteva dovela do blokiranja efekata polja u okoloždrelnim kompleksima kao i Br neuronima koji su izlagani magnetnom polju. Sa druge strane, prema rezultatima naših istraživanja efekat magnetnog polja na aktivnost Na^+/K^+ pumpe prvenstveno je posredovan fosfatazama, jer efekti magnetnog polja i fosfataza nisu bili aditivni u okoloždrelnim kompleksima izlaganim polju.

Aktivacija signalnih puteva regulisanih protein kinazama može dovesti i do aktivacije i do inhibicije aktivnosti Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu, pri čemu je neposredan efekat kinaza tkivno specifičan (Tabela 1). Sa druge strane, pokazano je da fosfataze neposredno dovode samo do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ pumpe (Tabela 1). Na ovaj način se mogu objasniti delimična neslaganja naših rezultata i rezultata dobijenih na drugoj vrsti puža *Otala lactea* (Ramnanan i Storey 2006). Naime, istraživanja uticaja signalnih puteva regulisanih protein kinazama A, G i C na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u homogenatima pripremljenim iz stopala i hepatopankreasa puža *O. lactea*, pokazala su da aktivacija kinaza smanjuje aktivnost pumpe, dok aktivacija puteva regulisanih različitim fosfatazama povećava njenu aktivnost.

U neuronima koji se odlikuju različitim bioelektričnim osobinama, aktivnost Na^+/K^+ pumpe je različito izražena. Stoga se može pretpostaviti da različiti neuroni u nervnom sistemu puža u različitoj meri doprinose povećanju aktivnosti Na^+/K^+ pumpe koje se uočava u magnetnom polju od 10 *mT*. Moguće je da je efekat magnetnog polja uočljiviji kod spontano aktivnih neurona koji brojno dominiraju u nervnom sistemu puža, u kojima je aktivnost pumpe više izražena nego kod nemih neurona. Naravno, ovu hipotezu tek treba potvrditi kroz niz eksperimenata u kojima bi bio ispitan uticaj statičkog magnetnog polja na aktivnost Na^+/K^+ pumpe većeg broja spontano aktivnih i nemih neurona puža.

Važno je razmotriti i ulogu glijalnih ćelija u uočenom efektu magnetnog polja na aktivnost Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža. Naime, istraživanja na pužu *H. lucorum* pokazala su da se promene bioelektričnih parametara neurona izazvane magnetnim poljem ne uočavaju ukoliko se glijalne ćelije uklone dejstvom proteolitičkih enzima (*Balaban i saradnici 1990*). Shodno tome, glijalne ćelije bi mogle doprineti gotovo dvostrukom povećanju aktivnosti Na^+/K^+ pumpe pod dejstvom statičkog magnetnog polja zapaženom u našim istraživanjima.

Metaboličko stanje neurona utiče na njegovu bioelektričnu aktivnost i bioelektrična aktivnost utiče na metaboličko stanje neurona. Aktivnošću Na^+/K^+ pumpe, značajna količina *ATP*-a troši se na ponovno uspostavljanje transmembranskih gradijenata koncentracija Na^+ i K^+ jona, tj. potencijala mirovanja membrane, koji se narušava prilikom generisanja akcionog potencijala. Na primer, spontana bioelektrična aktivnost neurona zahteva potrošnju približno 50% od ukupne količine *ATP*-a u mozgu pacova (*Du i saradnici 2008*). Jedan od zadataka ovog rada bio je i ispitivanje uticaja statičkog magnetnog polja jačine 10 *mT* na energetske metabolizam u nervnom sistemu puža. S obzirom na uočeno povećanje aktivnosti Na^+/K^+ pumpe pod dejstvom magnetnog polja u biohemijskim eksperimentima, moglo se očekivati da promena aktivnosti pumpe promeni energetske status nervnog sistema puža. Povećan aktivan transport 3Na^+ jona van ćelije i 2K^+ jona u ćeliju trebalo bi da dovede do povećanja utroška *ATP*-a. Rezultati dobijeni ^{31}P NMR spektroskopijom su pokazali da su površine β *ATP* signala, kao i odnos površina *ATP/ADP* signala u nervnom sistemu puža smanjeni u magnetnom polju, što je ukazivalo na povećanje potrošnje *ATP*-a. Međutim, pomenuti eksperimenti ne pokazuju značajno smanjenje koncentracije *ATP*-a (Tabela 5)

iako je Na^+/K^+ pumpa izraziti potrošač energije u nervnom sistemu. Najverovatniji uzrok manje izraženog smanjenja nivoa ATP -a su delimično hipoksični uslovi koji su postojali tokom izvođenja ^{31}P NMR eksperimenata. Promene energetskeg statusa uočene su i u nervnom sistemu kičmenjaka pod dejstvom promenljivog magnetnog polja. Naime, izlaganje visokofrekventnom magnetnom polju od 0,002 i 0,004 μT u trajanju od nekoliko minuta, smanjilo je nivo ATP -a u mozgu pacova za približno 20 % (Sanders i saradnici 1980). Autori ovih istraživanja pretpostavili su da je smanjenje nivoa ATP -a posledica delovanja magnetnog polja na transport elektrona u mitohondrijama.

Povećana aktivnost Na^+/K^+ pumpe povećava koncentraciju jona Na^+ u ekstraćelijskoj sredini i stvara veći gradijent Na^+ jona, čime utiče na aktivnost Na^+/H^+ izmenjivača, pH_i regulatornog sistema zavisnog od koncentracije Na^+ . U prethodnim istraživanjima pokazano je da promena aktivnosti Na^+/K^+ pumpe utiče na aktivnost Na^+/H^+ izmenjivača u ventrikularnim ćelijama srca pileta i pacova (Kim i Smith 1986, Saini i Dhalla 2007). U našim istraživanjima, pod dejstvom magnetnog polja došlo je do povećanja aktivnosti Na^+/K^+ pumpe, što je uticalo na povećanje aktivnosti Na^+/H^+ izmenjivača, izbacivanje više H^+ iz intracelularne sredine i povećanje pH_i u nervnom sistemu puža (Slika 24). Naravno, treba razmotriti i druge mehanizme putem kojih je magnetno polje moglo uticati na pH_i u nervnom sistemu puža. Kako je pH_i regulisana zajedničkim delovanjem različitih pH regulatornih sistema (Boron i saradnici 2009), moguće je i da Na^+ zavisni elektrogeni i elektroneutralni bikarbonatni transporteri doprinose uočenom povećanju pH_i . Povećanje pH_i moglo bi biti i posledica direktnog uticaja magnetnog polja na aktivnost Na^+/H^+ izmenjivača. U kontrolnim uslovima, vrednost pH_i izmerena u ^{31}P NMR eksperimentima (7,04) je niža u odnosu na prethodno izmerenu vrednost pH_i u neuronima puža (7,4) primenom pH senzitivnih elektroda (Thomas 1974). Ove razlike mogle bi biti posledica korišćenja različitih tehnika za merenje pH_i , kao i uticaja delimično hipoksičnih eksperimentalnih uslova u našim istraživanjima.

Promene u fosfatnom metabolizmu i pH_i u nervnom sistemu puža u uslovima kada je Na^+/K^+ pumpa inhibirana ouabainom, nisu ispitivane u ovom radu. Medjutim, podaci iz literature pokazuju da 5, 50 i 500 μM koncentracije ouabaina smanjuju pH_i u

hipokampalnim neuronima pacova (*Zhan i saradnici 1998*). Inhibicija pumpe 10^{-4} M ouabainom smanjuje pH_i i u srcu pacova (*Hoerter i saradnici 1986*). Iz literature je takođe poznato da promena bioelektrične aktivnosti neurona beskičmenjaka i kičmenjaka dovodi do značajnih promena u pH_i , kako u intracelularnoj tako i u ekstracelularnoj sredini (*Chesler i Kaila 1992, Chesler 2003*). U neuronima morskog puža *Archidoris montoyensis*, depolarizacija membrane i povećanje frekvencije generisanja akcionih potencijala dovodi do smanjenja pH_i (*Ahmed i Connor 1980*), a slični rezultati dobijeni su i u istraživanjima na neuronima hipokampusa kičmenjaka (*Chesler 2003*). Inhibicija Na^+/K^+ pumpe povećava intracelularnu koncentraciju Na^+ i Ca^{2+} , kao i ekstracelularnu koncentraciju K^+ , što dovodi do depolarizacije membrane i povećanja frekvencije generisanja akcionih potencijala u neuronima. Uzimajući u obzir prethodno opisane podatke iz literature, kao i efekte Na^+/K^+ pumpe na bioelektričnu aktivnost neurona, može se očekivati da nasuprot povećanju pH_i u uslovima izlaganja magnetnog polju u kojima je aktivnost Na^+/K^+ pumpe povećana, inhibicija pumpe smanji pH_i u nervnom sistemu puža. Svakako ovu pretpostavku treba potkrepiti dodatnim eksperimentima.

Biohemijske analize su pokazale, a *NMR* eksperimenti potvrdili, da magnetno polje od 10 mT povećava aktivnost Na^+/K^+ pumpe u nervnom sistemu puža, stoga je bilo neophodno ove rezultate potvrditi i na Br neuronu. Br neuron je odličan eksperimentalni model za takva ispitivanja, s obzirom na izraženu aktivnost Na^+/K^+ pumpe u ovom spontano aktivnom neuronu.

Promena potencijala mirovanja membrane (Slika 17, Tabela 7), važan je rezultat naših istraživanja koji je ukazao na značajnu ulogu Na^+/K^+ pumpe u promenama bioelektrične aktivnosti Br neurona izazvanih magnetnim poljem. Nasuprot hiperpolarizaciji membrane Br neurona koja je uočene u magnetnog polju, blokiranje Na^+/K^+ pumpe ouabainom izazvalo je depolarizaciju membrane Br neurona. Detaljnija analiza efekata ouabaina pokazala je da je depolarizacija membrane nakon blokiranja pumpe ouabainom bila gotovo dvostruko veća u Br neuronima koji su izlagani magnetnom polju u odnosu na kontrolne neurone (Tabela 8). Takvi podaci su pokazatelj da je promena potencijala mirovanja membrane izazvana magnetnim poljem posredovana povećanjem aktivnosti Na^+/K^+ pumpe. Rezultati naših istraživanja pokazuju da doprinos Na^+/K^+ pumpe membranskom potencijalu Br neurona iznosi

nekoliko mV , što je uporedivo sa vrednostima dobijenim na homologu Br neurona puža *H. aspersa* (Thomas 1969). Iako se doprinos Na^+/K^+ pumpe membranskom potencijalu Br neurona meri sa svega nekoliko mV , promene biofizičkih parametara u uslovima kada je pumpa blokirana ouabainom (Slika 25, Tabela 6) pokazuju da je ovaj doprinos pumpe važan za održavanje pravilne ritmične aktivnosti Br neurona. Rezultati naših istraživanja u saglasnosti su i sa rezultatima dobijenim kako na neuronima beskičmenjaka tako i na neuronima i srčanim ćelijama kičmenjaka u kojima je blokiranje Na^+/K^+ pumpe takođe izazivalo depolarizaciju membrane (Carpenter i Alving 1968, Willis i saradnici 1974, Levi 1992, Alvarez-Leefmans i saradnici 1994, Ballerini i saradnici 1997, Darbon i saradnici 2003, Wang i Huang 2004, 2006). Ovi podaci pokazuju da Na^+/K^+ pumpa ima suštinski istu ulogu u regulaciji bioelektrične aktivnosti ispitivanih nadražljivih ćelija beskičmenjaka i kičmenjaka.

Dalja ispitivanja pokazala su da se pod uticajem magnetnog polja narušava pravilnost oscilacija potencijala membrane Br neurona koje se nalaze u osnovi stvaranja paketića akcionih potencijala (Slika 32). Analiziranjem trajanja paketića i intervala između njih, ustanovljeno je da magnetno polje menja period oscilacija membranskog potencijala Br neurona skraćujući trajanje paketića akcionih potencijala. Detaljnija analiza promena u paketićima, pokazala je da magnetno polje skraćuje trajanje akcionog potencijala, produžava trajanje između intervala akcionih potencijala i smanjuje frekvenciju akcionih potencijala (Slike 33, 34, Tabela 7). Ovakve promene bioelektrične aktivnosti Br neurona u uslovima izlaganja magnetnom polju takođe ukazuju na značajnu ulogu Na^+/K^+ pumpe, jer je efekat ouabaina na trajanje prva tri akciona potencijala i prvog intervala između akcionih potencijala bio veći u Br neuronima koji su izlagani magnetnom polju (Tabela 8).

Uloga Na^+/K^+ pumpe u regulaciji trajanja akcionog potencijala i intervala između akcionih potencijala je već ispitivana. Inhibicija Na^+/K^+ pumpe skraćuje trajanje intervala između akcionih potencijala u neuronima suprahijazmatičnog jedra pacova (Wang i Huang 2006). Povećanje aktivnosti Na^+/K^+ pumpe skraćuje trajanje akcionog potencijala u Purkinjeovim vlaknima (Gadsby i Craneffield 1979; Gadsby 1985). U srčanim ćelijama, inhibicija Na^+/K^+ pumpe dovodi i do sužavanja i širenja akcionog potencijala (Levi 1991, Glitsch 2001, Ruch i saradnici 2003). Opisani različiti uticaji Na^+/K^+ pumpe na trajanje akcionog potencijala najverovatnije su posledica postojanja

različitih izoformi subjedinica Na^+/K^+ pumpe kao i različitih mehanizama regulacije njene aktivnosti u pomenutim eksperimentalnim modelima. Može se zaključiti da su istraživanja koja se odnose na ulogu Na^+/K^+ pumpe u regulaciji trajanja akcionog potencijala uglavnom izvođena na srčanim ćelijama. Iako naša istraživanja pružaju podatke o ulozi pumpe u regulaciji trajanja akcionog potencijala neurona koji ima bimodalnu bioelektričnu aktivnost, u nedostatku detaljnih podataka o osobinama Na^+/K^+ pumpe vinogradskog puža teško je govoriti o sličnosti našeg model neurona sa drugim eksperimentalnim modelima.

Promene izlazne struje Na^+/K^+ pumpe mogle bi se smatrati najjednostavnijim objašnjenjem promena bioelektrične aktivnosti Br neurona opisanim u ovim istraživanjima. Ukoliko bi doprinos struje Na^+/K^+ pumpe bio značajan, onda bi povećanje struje pumpe izazvano magnetnim poljem hiperpolarisalo membranu, smanjilo frekvenciju, skratilo trajanje akcionih potencijala i dovelo do sporijeg dostizanja praga za generisanje akcionih potencijala usled čega bi se povećalo trajanje intervala između akcionih potencijala Br neurona. Suprotno, inhibicija pumpe ouabainom bi smanjila struju Na^+/K^+ pumpe, što bi dovelo do depolarizacije membrane, povećanja frekvencije i širenja akcionog potencijala. Pri tome, depolarizacija membrane uzrokovala bi brže dostizanje praga za generisanje akcionog potencijala kao što je pokazano u neuronima suprahijazmatičnog jedra pacova (*Wang i Huang 2006*). Naravno, promena aktivnosti Na^+/K^+ pumpe uticala bi i na jonske struje zavisne od gradijenta Na^+ , kao što su Na^+ struja i Ca^{2+} zavisna K^+ struja (*Gadsby i Craneffield 1979*). Kako promena aktivnosti Na^+/K^+ pumpe izaziva depolarišuće i hiperpolarisuće promene membrane, promena aktivnosti pumpe uticala bi i na voltažno zavisne jonske struje. Lokalno smanjenje *ATP*-a, kao posledica povećane aktivnosti Na^+/K^+ pumpe, moglo bi imati uticaja i na *ATP* zavisne K^+ kanale. Usled toga, povećana aktivnost ovih kanala mogla bi da dovede do sužavanja akcionog potencijala (*Grover i Garlid 2000*).

Uloga Na^+/K^+ pumpe u regulaciji hiperpolarisućih intervala između paketića *AP*-a je već ispitivana u nekim od klasičnih istraživanja na Br neuronu (*Ayrapetyan 1976*) i njegovom homologu R15 neuronu kod *Aplysie* (*Junge i Stephens 1973*). Naša istraživanja, koja pokazuju da Na^+/K^+ pumpa učestvuje u regulaciji potencijala mirovanja membrane, trajanja paketića i trajanja akcionih potencijala, mogu se shvatiti

kao posledica kako promena u aktivnosti pumpe tako i promena u strujama koje su pod uticajem aktivnosti pumpe. Podatak, da je efekat ouabaina manje izražen na početku stvaranja paketića akcionih potencijala u odnosu na njegove kasnije faze, ističe da su povećanje intracelularne koncentracije Na^+ jona i/ili potrošnja *ATP*-a primarni događaji koji dovode do promena spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona.

Moguće je da je promena aktivnosti Na^+/K^+ pumpe uticala i na aktivnost $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivača što bi dovelo do promene intracelularne koncentracije Ca^{2+} jona (Lee 1985, Kim i saradnici 1987). Povećana aktivnost Na^+/K^+ pumpe pod uticajem magnetnog polja mogla je dovesti do smanjenja intracelularne koncentracije Ca^{2+} , što bi imalo uticaja na Ca^{2+} zavisne jonske struje koje održavaju bimodalnu aktivnost Br neurona. Usled toga bi došlo do smanjenje trajanje paketića akcionih potencijala, što je i uočeno u našim istraživanjima.

Imajući u vidu visok stepen sličnosti u strukturi Na^+/K^+ iz različitih vrsta (Slika 3), promene bioelektričnih osobina neurona u različitim eksperimentalnim modelima pod uticajem kako statičkog tako i promenljivog magnetnog polja različitih jačina, mogle bi biti uzrokovane promenama u aktivnosti Na^+/K^+ pumpe. Slično našim podacima, smanjenje trajanja paketića akcionih potencijala uočeno je i u spontano aktivnim neuronima vinske mušice pri izlaganju statičkom magnetnom polju od 3 T (Yang i saradnici 2011). Promenljivo magnetno polje jačine 207,2 μT , 0,8 mT i 2 mT dovodi do hiperpolarizacije membrane, sužavanja akcionog potencijala i širenja intervala između akcionih potencijala spontano aktivnog F1 neurona puža *H. aspersa* (Moghadam i saradnici, 2008, 2011). U saglasnosti sa našim rezultatima, magnetno polje jačine 8,04 mT povećava amplitudu akcionog potencijala lateralnog neurona rečnog raka (Ye i saradnici 2004). Smanjenje frekvencije akcionih potencijala zapaženo je u lateralnom genikulatnom telu mačke pod dejstvom magnetnog polja od 123 mT (Rosen i Lubowsky 1990), kao i u neuronima dorzalnog korena ganglije miša pod dejstvom magnetnog polja jačine 10 mT (McLean i saradnici 1995). Iako su efekti magnetnog polja na drugim eksperimentalnim modelima uporedivi sa našim rezultatima, ovakva pojednostavljena poređenja ne isključuju i druge mehanizme putem kojih je magnetno polje moglo uticati na promene bioelektričnih osobina neurona.

SPECIFIČNOST DELOVANJA UMERENO JAKOG STATIČKOG MAGNETNOG POLJA

Rezultati ovog rada pokazali su da je efekat statičkog magnetnog polja specifičan za određeni neuron. Naime, statičko magnetno polje jačine $2,7 \text{ mT}$ i 10 mT promenilo je bioelektrične parametre spontano aktivnog Br neurona, dok promene ispitivanih bioelektričnih parametara kod nemog N1 neurona nisu uočene. Rezultati istraživanja na različitim neuronima puža *H. lucorum* takođe su sugerisali da bi efekat magnetnog polja mogao biti specifičan za određene neurone (*Balaban i saradnici 1990*). Istraživanja na spontano aktivnim RPa5 i RPa28 neuronima i nemim LPal3 i RP11 neuronima pokazala su da statičko magnetno polje jačine reda veličine mT , smanjuje otpor membrane nemih neurona i povećava otpor membrane ispitivanih spontano aktivnih neurona. Takođe, u istoj studiji, smanjenje frekvencije akcionih potencijala uočeno je samo kod RPa5 neurona, dok kod spontano aktivnih neurona u visceralnoj gangliji ovaj efekat magnetnog polja nije uočen. U drugoj studiji na neuronima puža *H. aspersa* u visceralnoj i parijetalnim ganglijama, efekat statičkog magnetnog polja od 115 mT i 260 mT okarakterisan je kao inhibitoran za 86% ispitivanih neurona jer je dovodio do smanjenja frekvencije akcionih potencijala i hiperpolarizacije membrane i stimulatoran za preostalih 14% neurona jer je dovodio do depolarizacije membrane i povećanja frekvencije akcionih potencijala (*Azanza i del Moral 1994*). Fine razlike između efekata ispitivanih magnetnih polja bile su specifične za određene neurone (*Azanza i del Moral 1994*). Naime, magnetno polje je potpuno inhibiralo stvaranje akcionih potencijala spontano aktivnog neurona u desnoj parijetalnoj gangliji, dok je povećalo frekvenciju akcionih potencijala neurona u visceralnoj gangliji kojeg odlikuje spontana bimodalna aktivnost. Pod uticajem magnetnog polja bimodalna aktivnost spontano aktivnog neurona u levoj parijetalnoj gangliji se menja, tj. gubi pravilnost u stvaranju paketića akcionih potencijala. Takođe, magnetno polje je izazvalo hiperpolarizaciju membrane nemog neurona u desnoj parijetalnoj gangliji.

Iako su istraživanja u kojima je ispitivan uticaj magnetnog polja na neuronima koje odlikuje različita bioelektrična aktivnost u istom eksperimentalnom modelu malobrojna, rezultati navode na pretpostavku da je uticaj magnetnog polja zavistan od bioelektričnih osobina membrane neurona. Može se pretpostaviti da su zahtevi nemog N1 neurona za izraženom aktivnošću Na^+/K^+ pumpe manji nego u Br neuronu pa stoga

nisu uočene značajne promene bioelektrične aktivnosti N1 neurona pod dejstvom magnetnog polja. Manje izražena aktivnost Na^+/K^+ pumpe mogla bi biti uzrokovana prisustvom druge izoforme pumpe, kao i drugačijih mehanizama regulacije njene aktivnosti u N1 neuronu u odnosu na Br neuron.

S obzirom da je u elektrofiziološkim eksperimentima u ovom radu okoloždrelni ganglijski kompleks bio izložen magnetnom polju, mora se uzeti u obzir i mogućnost delovanja statičkog magnetnog polja na druge neurone u nervnom sistemu puža. Naime, putem sinaptičkih uticaja i drugi neuroni bi mogli da utiču na promene bioelektričnih parametara Br neurona pod dejstvom magnetnog polja.

ZAVISNOST PROMENA BIOELEKTRIČNIH PARAMETARA NEURONA OD JAČINE MAGNETNOG POLJA

Ispitivanja koja se odnose na efekte statičkog magnetnog polja različite jačine na bioelektričnu aktivnost Br neurona, pokazala su da je efekat magnetnog polja zavistan od njegove jačine. Naime, magnetno polje od 10 *mT* značajno je promenilo sve ispitivane parametre bioelektrične aktivnosti, tj. potencijal mirovanja membrane, frekvenciju, amplitudu i trajanje akcionog potencijala, dok slabije magnetno polje od 2,7 *mT* nije značajno promenilo potencijal mirovanja membrane i frekvenciju akcionih potencijala Br neurona. Važno je reći da su oba magnetna polja dovodila do hiperpolarizacije membrane i smanjenja frekvencije akcionih potencijala Br neurona, ali promena izazvana slabijim 2,7 *mT* magnetnim poljem nije dostizala statističku značajnost. Takođe, promene bioelektričnih parametara Br neurona na koje su uticala oba magnetna polja, amplituda i trajanje akcionog potencijala, bile su srazmerne jačini polja (Slike 19 i 20). Slični rezultati dobijeni su ranije na neuronima puža *H. lucorum* (Balaban i saradnici 1990). Promene otpora membrane ispitivanih neurona puža srazmerna je jačini statičkog magnetnog polja čije su vrednosti 23, 120 i 200 *mT*. U studiji na neuronima puža *H. aspersa*, u kojoj su ispitivani efekti statičkog magnetnog polja od 0-720 *mT*, pokazano je da se frekvencija akcionih potencijala spontano aktivnih neurona smanjuje srazmerno jačini magnetnog polja, pri čemu je pri jačini polja od 570 *mT* generisanje akcionih potencijala potpuno inhibirano (Azanza i del Moral 1994).

Skoro da ne postoje podaci o zavisnosti promena bioelektričnih parametara neurona kičmenjaka od jačine statičkog magnetnog polja, jer su istraživanja vršena

uglavnom korišćenjem jedne jačine. Međutim, studija na ćelijskoj liniji humanih glioblastoma pokazala je da su promene na površini membrana ovih ćelija srazmerne jačini statičkog magnetnog polja vrednosti 8, 30 i 300 mT (Teodori i saradnici 2005). Promene na površini membrane u vidu mikroinvaginacija su povezivane sa reorganizacijom proteina aktina. Iako se ovi rezultati ne odnose direktno na uticaj magnetnog polja na bioelektrične osobine nervnih ćelija, oni posredno ukazuju da bi promena u strukturi membrane mogla imati uticaja na funkcije jonskih kanala i jonskih pumpi, što bi imalo uticaja na bioelektričnu aktivnost ćelija.

Sa ciljem da se potpunije sagleda dejstvo magnetnog polja od 2,7 mT i 10 mT na bioelektričnu aktivnost Br neurona, bioelektrični parametri su analizirani i po završetku izlaganja neurona polju. Rezultati elektrofizioloških eksperimenata pokazali su da je efekat magnetnog polja obe jačine produžen i da se može uočiti i nakon izlaganja neurona polju tokom perioda od 20 min . Produžen efekat jačeg magnetnog polja od 10 mT uočen je na svim ispitivanim parametrima, dok je produžen efekat slabijeg 2,7 mT magnetnog polja uočen na parametrima amplitude i trajanja akcionog potencijala. I po prestanku izlaganja Br neurona magnetnom polju, promene parametara na koja su uticala oba magnetna polja zavisile su od jačine polja (Tabele 3 i 4). Izmerene promene amplitude i trajanja akcionog potencijala bile su gotovo dvostruko veće nakon izlaganja Br neurona jačem magnetnom polju od 10 mT . Opisani efekti magnetnog polja u saglasnosti su sa drugim istraživanjima koja pokazuju da akutno dejstvo statičkog magnetnog polja traje određeno vreme od prestanka izlaganja ćelija nervnog sistema polju. Trajanje perioda tokom kojih se može uočiti produžen efekat magnetnog polja je različit i kreće se u intervalu od nekoliko minuta do nekoliko časova. Na primer, produžen efekat magnetnog polja uočava se tokom 3 min od prestanka izlaganja ćelijske linije GH3 ćelija polju od 123 mT (Rosen 1996). Produžen efekat magnetnog polja uočen je i u populaciji neurona strižibube 5 min od prestanka izlaganja neurona polju od 2 mT (Todorović i saradnici 2007). Smanjenje frekvencije akcionih potencijala neurona puža *H.lucorum* uočava se i 20 min od prestanka izlaganja neurona polju od 23 mT (Balaban i saradnici 1990). Izlaganje lateralnog gigantskog neurona rečnog raka vrste *P. clarkii* magnetnom polju od 8,04 mT povećava amplitudu akcionog potencijala koja se može uočiti i 3 h po prestanku izlaganja neurona polju (Ye i saradnici 2004).

Odredjivanje mehanizama putem kojih statičko magnetno polje ostvaruju svoje produženo dejstvo na bioelektričnu aktivnost Br neuona nisu bila predmet ovog istraživanja. Moguće je da je ovaj efekat magnetnog polja posredovan promenama u aktivnosti različitih enzima, kao i promenama u signalnim putevima regulisanim sekundarnim ćelijskim glasnicima, s obzirom da je efekat magnetnog polja bio izraženiji nakon prestanka izlaganja Br neurona polju. Svakako treba uzeti u obzir i mogućnost da bi produženo dejstvo magnetnog polja moglo biti i rezultat promena u strukturi membrana ćelija nervnog sistema.

Iako rezultati naših istraživanja pružaju podatke o delovanju samo dve jačine magnetnog polja, ipak ukazuju da su promene ispitivanih bioelektričnih parametara, zavisne od jačine polja. Svakako bi rezultati bili potpuniji da je u eksperimente bila uključena još najmanje jedna vrednost jačine polja. Ipak, dobijeni rezultati stvorili su osnove za istraživanja u kojima bi se sistematski ispitala zavisnost promena bioelektričnih parametara od magnetnog polja većeg broja vrednosti jačina.

ZNAČAJ RADA I BUDUĆA ISTRAŽIVANJA

Rezultati istraživanja ovog rada pokazali su da statičko magnetno polje jačine $2,7\text{ mT}$ i 10 mT modulišu odgovor spontano aktivnog Br neurona vinogradskog puža *Helix pomatia*, menjajući parametre koji karakterišu njegovu bioelektričnu aktivnost. Utvrđeno je da magnetno polje od 10 mT povećava aktivnost Na^+/K^+ pumpe u čitavom nervnom sistemu puža i da su promene bioelektričnih parametara Br neurona nastale pod dejstvom ovog magnetnog polja posredovane povećanjem aktivnosti Na^+/K^+ pumpe. Na taj način ovaj rad je pružio dodatna objašnjenja koja se odnose na razumevanje mehanizama delovanja magnetnog polja na bioelektrične osobine neurona. U narednim istraživanjima primenom metode nametnute voltaže na deliću membrane ispitaće se efekat magnetnog polja od 10 mT na struju Na^+/K^+ pumpe većeg broja neurona u nervnom sistemu vinogradskog puža. Opšti značaj ovog rada odnosi se na mogućnost primene saznanja o uticaju magnetnog polja na nervni sistem puža i na nervni sistem drugih vrsta. Naime, bimodalna spontana aktivnost koja karakteriše Br neuron, karakteriše i neurone mnogih beskičmenjaka i kičmenjaka, dok je funkcija Na^+/K^+ pumpe ista na membranama svih životinjskih ćelija.

Proučavanje promena bioelektrične aktivnosti neurona pod dejstvom umereno jakog statičkog magnetnog polja je od velike važnosti s obzirom da je ovo magnetno polje prisutno u životnoj sredini. Važno je razjasniti i mehanizme delovanja magnetnog polja na biofizičke osobine membrana usled sve veće primene magnetnog polja u terapijske svrhe, s tim što odgovarajuća jačina polja i dužina izlaganja polju tek treba da budu precizno određene. Jačine polja ispitivane u našim istraživanjima, odgovaraju efektivnoj jačini polja korišćenju za ublažavanje bola u osteoartritisu (*Harlow i saradnici 2004, Wolsko i saradnici 2004*), dok je jače polje od 100 *mT* ispitivano usled moguće primene u lečenju Parkinsonove bolesti (*Wang i saradnici 2010*).

ZAKLJUČCI

Zaključci o kratkotrajnom dejstvu (15 min) magnetnog polja jačine 2,7 i 10 mT na bioelektričnu aktivnost Br i N1 neurona puža:

1. Magnetno polje jačine 2,7 mT i 10 mT menja bioelektrični ritam spontano aktivnog Br neurona.
2. Slabije magnetno polje od 2,7 mT povećava amplitudu i smanjuje trajanje akcionog potencijala Br neurona. Jače magnetno polje od 10 mT dovodi do hiperpolarizacije membrane, smanjenja frekvencije akcionih potencijala, povećanja amplitude i smanjenja trajanja akcionog potencijala Br neurona.
3. Promene trajanja i amplitude akcionog potencijala Br neurona srazmerne su jačini magnetnog polja.
4. Dejstvo magnetnog polja je produženo. Smanjenje trajanja i povećanje amplitude akcionog potencijala izazvano magnetnim poljem od 2,7 mT, kao i hiperpolarizacija membrane, povećanje amplitude, smanjenje trajanja i frekvencije akcionih potencijala izazvani magnetnim poljem od 10 mT, uočava se i tokom perioda od 20 min nakon prestanka izlaganja Br neurona polju.
5. Magnetno polje jačine 2,7 i 10 mT ne utiče na bioelektričnu aktivnost nemog N1 neurona
6. Dejstvo magnetnog polja je specifično za određeni neuron.

Zaključci o kratkotrajnom dejstvu (15 min) magnetnog polja jačine 10 mT na aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe u nervnom sistemu puža:

1. Magnetno polje povećava aktivnost Na⁺/K⁺ pumpe u nervnom sistemu puža.
2. Povećanje aktivnosti Na⁺/K⁺ pumpe posredovano je procesima fosforilacije i defosforilacije.
3. Izlaganje magnetnom polju dovodi do smanjenja β ATP signala i odnosa β ATP/ γ ATP signala u nervnom sistemu puža, ali promene ne dostižu statističku značajnost.

4. Posredstvom Na^+/H^+ izmjenjivača, magnetno polje dovodi do povećanja $p\text{Hi}$ u nervnom sistemu puža.
5. Magnetno polje povećava aktivnost Na^+/K^+ pumpe u Br neuronu.
6. Hiperpolarizacija membrane, smanjenje trajanja akcionog potencijala i povećanje intervala između akcionih potencijala u Br neuronu pod dejstvom magnetnog polja, posredovani su povećanom aktivnošću Na^+/K^+ pumpe

Zaključci o ulozi Na^+/K^+ pumpe u regulaciji spontane bioelektrične aktivnosti Br neurona:

1. Na^+/K^+ pumpa reguliše oscilacije membranskog potencijala Br neurona koje se nalaze u osnovi njegove spontane ritmične aktivnosti.
2. Na^+/K^+ pumpa učestvuje u regulaciji trajanja paketića, trajanja i amplitude intervala između paketića akcionih potencijala, kao i frekvencije akcionih potencijala Br neurona.
3. Inhibicija Na^+/K^+ pumpe ouabainom dovodi do širenja akcionog potencijala i smanjenja intervala između akcionih potencijala Br neurona.

LITERATURA

Ahmed Z, Connor J (1980). Intracellular pH changes induced by calcium influx during electrical activity in molluscan neurons. *J Gen Physiol* 75(4):403-26

Alevizos A, Weiss K, Koester J (1991). Synaptic actions of identified peptidergic neuron R15 in *Aplysia*. III. Activation of the large hermaphroditic duct. *J. Neurosci.* 11: 1282–1290

Alvarez-Leefmans F, Cruzblanca H, Gamiño SM, Altamirano J, Nani A, Reuss L (1994). Transmembrane ion movements elicited by sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurons. *J Neurophysiol.* 71(5):1787-96

Alving B (1968). Spontaneous activity in isolated somata of *Aplysia* pacemaker neurons. *J. Gen. Physiol.* 51:29-45

Arnold A, Labrot T, Oda R, Dufourc E (2002). Cation modulation of bicelle size and magnetic alignment as revealed by solid-state NMR and electron microscopy. *Biophys J* 83(5):2667-80

Arvanitaki-Chalazonitis A, Chalazonitis N (1955). Intracellular bioelectric potentials of the giant neuron of *Aplysia* during autorhythmic activity. *C R Hebd Seances Acad Sci* 240(3):349-51

Ayrapetyan S (1973). On the regulation of the mechanisms of rhythmic activity of *Helix* neurons. In: Salanki J (ed), *Neurobiology of invertebrates. Mechanisms of Rhythm regulation.* Akademiai Kiado, Budapest, pp 81-92

Ayrapetyan S (1976). Involvement of the sodium pump in slow oscillations underlying the bursting pattern in *Helix* neurons. In: Salanki J (ed), *Neurobiology of invertebrates.* Akademiai Kiado, Budapest, pp 353-370

Azanza M, del Moral A (1994). Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Prog Neurobiol.* 44(6):517-601

- Balaban P, Bravarenko N, Kuznetsov A** (1990). Influence of a stationary magnetic field on bioelectric properties of snail neurons. *Bioelectromagnetics* 11:13–25
- Bal T, McCormick D** (1993). Mechanisms of Oscillatory activity in Guinea-Pig nucleus reticularis thalaei in vitro: A mammalian pacemaker. *Journal of Physiology* (1993), 468, pp. 669-691
- Ballerini L, Bracci E, Nistri A** (1997). Pharmacological block of the electrogenic sodium pump disrupts rhythmic bursting induced by strychnine and bicuculline in the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 77:17-23
- Barker J, Gainer H** (1975). Studies on bursting pacemaker activity in molluscan neuron. I. Membrane properties and ionic contribution. *Brain Res.* 84: 461-477
- Beck A, Lohr C, Nett W, Deitmer J** (2001). Bursting activity in leech Retzius neurons induced by low external chloride. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 442:263–272
- Beggah A, Jaunin P, Geering K** (1997). Role of glycosylation and disulfide bond formation in the b subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272:10318–10326
- Benson J, Adams W** (1987). The control of rhythmic neuronal firing. In *Neuromodulation* (ed. L Kaczmarek and I Levitan), pp 100-118. New York: Oxford University Press
- Blank M, Soo L** (1996). The threshold for Na, K-ATPase stimulation by electromagnetic fields. *Bioelectroch. Bioener.* 40: 63-65
- Boron W, Chen L, Parker M** (2009). Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters. *J Exp Biol* 212(Pt 11):1697-1706
- Bower J, Beeman D** (1998). Ion channels in Bursting Neurons. In: *The Book of GENESIS: Exploring Realistic Neural Models with the GEneral NEural SIMulation System*, pp 97-130. Second edition, Springer-Verlag, New York

- Bradford M** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Braganza L, Blott B, Coe T, Melville D** (1984). The superdiamagnetic effect of magnetic fields on one and two component multilamellar liposomes. *Biochim Biophys Acta* 801(1):66-75
- Brumberg J, Nowak L, McCormick D** (2000). Ionic Mechanisms Underlying Repetitive High-Frequency Burst Firing in Supragranular Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 20(13):4829–4843
- Buck L, Espanol M, Litt L, Bickler P** (1998). Reversible decreases in ATP and PCr concentrations in anoxic turtle brain. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 120:633-639
- Burton R** (1971). Natural variation in cation levels in the blood of three species of land snail (Pulmonata, Helicidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 39A: 267-275
- Carpenter D, Alving B** (1968). A contribution of an electrogenic Na⁺ pump to membrane potential in *Aplysia* neurons. *J Gen Physiol* 52:1-21
- Carpenter D, McCreery J, Woodbury C, Jarowsky P** (1978). Modulation of endogenous discharge in neuron R15 through specific receptors for several neurotransmitters. In: Chalazonitis, N., Boisson, M. (Eds.), *Abnormal Neuronal Discharges*. Raven Press, New York, pp. 189–203
- Catarsi S, Scuri R, Brunelli M** (1993). Cyclic AMP mediates inhibition of the Na⁽⁺⁾-K⁺ electrogenic pump by serotonin in tactile sensory neurones of the leech. *J Physiol.* 462:229-42
- Chesler M, Kaila K** (1992). Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci* 15(10):396-402
- Chesler M** (2003). Regulation and Modulation of pH in the Brain. *Physiol Rev* 83 (4): 1183–1221

- Chow D, Forte J** (1995). Functional significance of the b subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J. Exp. Biol.* 198:1–17
- Crambert G, Schaer D, Roy S, Geering K** (2004). New molecular determinants controlling the accessibility of ouabain to its binding site in human Na,K-ATPase alpha isoforms. *Mol Pharmacol* 65: 335–341
- Darbon P, Tschertter A, Yvon C, Streit J** (2003). Role of the electrogenic Na/K pump in disinhibition-induced bursting in cultured spinal networks. *J Neurophysiol* 90:3119-3129
- Du F, Zhu XH, Zhang Y, Friedman M, Zhang N, Ugurbil K, Chen W** (2008). Tightly coupled brain activity and cerebral ATP metabolic rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 29;105(17):6409-14
- Elekes K, Vehovszky A, Salanki J** (1983). Ultrastructure of synaptic connections of a bimodal pacemaker giant neuron in the central nervous system of *Helix Pomatia* L. *Neuroscience* Vol. 8. No. 3, pp. 617-629
- Ellis D, Nathanson J, Sweadner K** (2000). Carbachol inhibits Na(+)-K(+)-ATPase activity in choroid plexus via stimulation of the NO/cGMP pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(6):C1685-93
- Ermakov Y, Averbakh A, Yusipovich A, Sukharev S** (2001). Dipole potentials indicate restructuring of the membrane interface induced by gadolinium and beryllium ions. *Biophys J* 80(4):1851-62
- Ewald D, Levitan I** (1987). Ion channels regulated by calcium. In: Kaczmarek L, Levitan I (eds) *Neuromodulation*, Oxford University Press, New York, pp 138-158
- Fisone G, Snyder G, Aperia A, Greengard P** (1998). Na⁺,K⁺-ATPase phosphorylation in the choroid plexus: synergistic regulation by serotonin/protein kinase C and isoproterenol/cAMP-PK/PP-1 pathways. *Mol Med* 4(4):258-65

- Flatman P, Lew V** (1981). The magnesium dependence of sodium-pump-mediated sodium-potassium and sodium-sodium exchange in intact human red cells. *J Physiol* 315:421-46
- Foley L, Gegear R, Reppert S** (2011). Human cryptochrome exhibits light-dependent magnetosensitivity. *Nature Communications*. 2:356
- Fuller M, Dobson J, Wieser HG, Moser S** (1995). On the sensitivity of the human brain to magnetic fields: evocation of epileptiform activity. *Brain Res Bull* 36(2):155-9
- Gadsby D, Cranefield P** (1979). Electrogenic sodium extrusion in cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 73:819-837
- Gadsby D** (1985). Influence of Na/K pump current on action potentials in Purkinje fibers. *Adv Myocardiol* 5:279-294
- Gadsby D, Takeuchi A, Artigas P, Reyes N** (2009). Peering into an ATPase ion pump with single-channel recordings. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 229-238
- Gahwiler B, Dreifuss J** (1979). Phasically firing neurons in long-term cultures of the rat hypothalamic supraoptic area: pacemaker and follower cells. *Brain Res*.117: 95-103
- Gegear R, Foley L, Casselman A, Reppert S** (2010). Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature*. 463(7282):804-7
- Giraud F, Claret M, Bruckdorfer K, Chailley B** (1981). The effects of membrane lipid order and cholesterol on the internal and external cationic sites of the Na⁺,K⁺-pump in erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 647: 249–258
- Glitsch H** (2001). Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol Rev* 81: 1791-1826
- Godfraind T** (1984). Mechanism of action of cardiac glycosides. *European Heart Journal* 5 (Supplement F) 303-308

- Gola M** (1976). Electrical properties of bursting pacemaker neurons. In: Salanki J (ed), Neurobiology of invertebrates. Akademiai Kiado, Budapest, pp 381-423
- Goldstein J, Mok J, Simon C, Leiter J** (2000). Intracellular pH regulation in neurons from chemosensitive and nonchemosensitive regions of *Helix aspersa*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R414-R423
- Grover G, Garlid K** (2000). ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 32:677–695
- Hablitz J, Johnston D** (1981). Endogenous nature of spontaneous bursting in hippocampal pyramidal neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1: 325-332
- Harris-Warrick R, Flamm R** (1987). Multiple Mechanisms of Bursting in a Conditional Bursting Neuron. *The Journal of Neuroscience.* 7(7): 2113-2128
- Harlow T, Greaves C, White A, Brown L, Hart A, Ernst E** (2004). Randomised controlled trial of magnetic bracelets for relieving pain in osteoarthritis of the hip and knee. *BMJ* 329(7480):1450–1454
- Heyse S, Wuddel I, Apell H, Sturmer W** (1994). Partial Reactions of the Na, K ATPase: Determination of Rate Constants. *J. Gen. Physiol* 104:197-240
- Hille B** (2001). Potassium channels and chloride channels. In: Ion channels of excitable membranes 3rd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, pp 131-169
- Hoerter J, Miceli M, Renlund D, Jacobus W, Gerstenblith G, Lakatta E** (1986). A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of the metabolic, contractile, and ionic consequences of induced calcium alterations in the isovolumic rat heart. *Circulation Research* 58:539-551
- Horisberger J** (2004). Recent Insights into the Structure and Mechanism of the Sodium Pump. *Physiology* 19:377-387

- Hosoi R, Matsuda T, Asano S, Nakamura H, Hashimoto H, Takuma K, Baba A** (1997). Isoform-specific up-regulation by ouabain of Na⁺,K⁺-ATPase in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 69(5):2189-96
- ICNIRP** (2009). Guidelines on limits of exposure to static magnetic fields *Health Physics* 96:504-514
- Itegin M, Gunay I, Logoglu G, Isbir T** (1995). Effects of static magnetic field on specific adenosine-5'-triphosphatase activities and bioelectrical and biomechanical properties in the rat diaphragm muscle. *Bioelectromagnetics* 16(3):147-51
- Jahan-Parwar B, Smith M, Baumgarten R Von** (1969). Activation of neurosecretory cells in *Aplysia* by osphradial stimulation. *J Physiol (London)* 216: 1246–1257
- Jie-Fei S, Yong-Lie C, Li D** (2007). Effects of static magnetic fields on the voltage-gated potassium channel currents in trigeminal root ganglion neurons. *Neurosci Letts* 415:164–168
- Johannsson A, Smith G, Metcalfe J** (1981). The effect of bilayer thickness on the activity of (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 6;641(2):416-21
- Johnsen S, Lohmann K** (2005). The physics and neurobiology of magnetoreception. *Nat Rev Neurosci*.6(9):703-12
- Johnson S, Seutin V, North R** (1992). Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science* 258:665-667
- Jorgensen P** (1975). Purification and characterization of (Na⁺,K⁺)-ATPase V. Conformational changes in the enzyme. Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool. *Biochim. Biophys. Acta* 401: 399–415
- Jorgensen P, Hakansson K, Karlisch S** (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol*.65:817-49
- Junge D, Stephens C** (1973). Cyclic variation of potassium conductance in a burst-generating neurone in *Aplysia*. *J Physiol* 235:155-181

- Kai-Kai A** (1979). Electrophysiology and Pharmacology of Neurosecretory cells in the Brain of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A:493-507
- Kartelija G, Pasic M** (1982). Electrophysiological and pharmacological properties of giant silent neuron in the *Helix pomatia* left parietal ganglion. *Iugosl. Physiol. Pharmacol. Acta* 18: 79–87
- Kartelija G** (1975). Spontana bioelektrična aktivnost neurona u ganglijama puža (*Helix*) i promena njene ritmike. Magistarski rad
- Kartelija G** (1992). Reaktivnost centralnih neurona *Helix pomatia* na neurotransmitere i na svetlost, Doktorska disertacija
- Kartelija G, Nedeljkovic M, Radenovic L** (2003). Photosensitive neurons in mollusks. *Comparative biochemistry and Physiology Part A* 134: 483-495
- Kauppinen R, Williams S** (1994). Nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the brain. *Prog Neurobiol* 44:87-118
- Kerkut G, Lambert I, Gayton R, Loker E** (1975). Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50(1)A: 1-25
- Kim D, Smith T** (1986). Effects of amiloride and ouabain on contractile state, Ca and Na fluxes, and Na content in cultured chick heart cells. *Mol Pharmacol* 29:363-371
- Kim D, Cragoe E, Smith T** (1987). Relations among sodium pump inhibition, Na-Ca and Na-H exchange activities, and Ca-H interaction in cultured chick heart cells. *Circ. Res* 60:185-193
- Kimelberg H, Papahadjopoulos D** (1972). Phospholipid requirements for (Na⁺,K⁺)-ATPase activity: head group specificity and fatty acid fluidity. *Biochim Biophys Acta* 282: 277–292
- Kimelberg H, Mayhew E** (1975). Increased ouabain-sensitive ⁸⁶Rb⁺ uptake and sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase activity in transformed cell lines. *J Biol Chem* 250: 100–104

Kominato R, Fujimoto S, Mukai E, Nakamura Y, Nabe K, Shimodahira M, Nishi Y, Funakoshi S, Seino Y, Inagaki N (2008). Src activation generates reactive oxygen species and impairs metabolism-secretion coupling in diabetic Goto-Kakizaki and ouabain-treated rat pancreatic islets. *Diabetologia* (7):1226-35

Kononenko N (1979a). Modulation of the endogenous electrical activity of the bursting neuron in the snail *Helix pomatia*—I. The generator of the slow rhythms. *Neuroscience*. 4 (12): 2037–2045

Kononenko N (1979b). Modulation of the endogenous electrical activity of the bursting neuron in the snail *Helix pomatia*—II. The membrane characteristics related to modulation of the endogenous activity of the neuron. *Neuroscience* 4(12):2047-54

Kononenko N (1993). Mechanisms of membrane potential oscillation in bursting neurons on the snail, *Helix pomatia*. *Camp. Biochem. Physiol.* Vol. 106A (1): 135-14

Kononenko N (2000). Role of the axodendritic tree in the functioning of *Helix* bursting neurons: generation of pacemaker activity and propagation of action potentials along the axon. *Neuroscience* 96: 399–406

Kuhlbrandt W (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(4):282-95

Lee C (1985). 200 years of digitalis: the emerging central role of the sodium ion in the control of cardiac force. *Am J Physiol* 249:C367–C378

Levenson R (1994). Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 123:1–45

Levi A (1991) The effect of strophanthidin on action potential, calcium current and contraction in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 443:1–23

Levi A (1992). The electrogenic sodium/potassium pump and passive sodium influx of isolated guinea pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 3:225–238

- Levitan E, Kramer R, Levitan I** (1987). Augmentation of bursting pacemaker activity by egg-laying hormone in Aplysia neuron R15 is mediated by a cyclic AMP-dependent increase in Ca²⁺ and K⁺ currents. Proc Natl Acad Sci U S A. 84(17):6307-11
- Levitan E, Levitan I** (1988). A cyclic GMP analog decreases the currents underlying bursting activity in the Aplysia neuron R15. J Neurosci 8:1162–1171
- Lingrel J, Kuntzweiler T** (1994). Na⁺,K⁺-ATPase. J. Biol. Chem. 269: 19659–19662
- Lisman J** (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. Trends Neurosci. 20(1):38-43
- Lutsenko S, Kaplan J** (1995). Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. Biochemistry 34:15607–15613
- Madshus I** (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. Biochem. J. 250, 1-8
- Marcaida G, Kosenko E, Miñana M, Grisolia S, Felipo V** (1996). Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. J Neurochem 66(1):99-104
- Marcus M, Apell H-J, Roudna M, Schwendener R, Weder H-G, and Lauger P** (1986). (Na⁺,K⁺)-ATPase in artificial lipid vesicles: influence of lipid structure on pumping rate. Biochim Biophys Acta 854: 270–278
- Mathieu P, Roberge F, Gulrajani R** (1976). Perfusion with reduced Na⁺ sea-water disassociates slow oscillations from action potentials in Aplysia bursting cells. In: Salanki J (ed), Neurobiology of invertebrates. Akademiai Kiado, Budapest, pp 437-44
- McCormick D** (2008). Membrane potential and action potential. In: Squire L, Bloom F, Spitzer N, du Lac S, Ghosh A, Berg D (eds) Fundamental neuroscience, 3rd edn. Academic Press/Elsevier pp 112-132
- McDonough A, Geering K, Farley R** (1990). The sodium pump needs its beta subunit. FASEB J. 4: 1598–1605

McLean M, Holcomb R, Wamil A, Pickett J, Cavopol A (1995). Blockade of sensory neuron action potentials by a static magnetic field in the 10 mT range
Bioelectromagnetics 16:20-32

McNamara R, Arias-Mendoza F, Brown T (1994). Investigation of broad resonances in ^{31}P NMR spectra of the human brain in vivo. NMR Biomed 7:237-242

Meincke K (1975). The chemical ingredients of hemolymph and some selected organs of *Helix pomatia* in constant ambient conditions in the course of the year. Comp. Biochem. Physiol. A 52: 135-140

Mercer R, Biemesderfer D, Bliss D, Collins J, Forbush B (1993). Molecular cloning and immunological characterization of the g-polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. J. Cell Biol. 121: 579–586

Mercer R (1993). Structure of the Na,K-ATPase. Int. Rev. Cytol. 137: 139–168

Mimura T, Kirino Y (1984). Changes in cytoplasmic pH measured by ^{31}P NMR in cells of *Nitellopsis obtusa*. Plant & Cell Physiol 25:813-820

Mobasher A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader M, Trevan M, Francis M, Lamb J, Martin-Vasallo P (2000). Na⁺, K⁺-ATPase Isozyme Diversity; Comparative Biochemistry and Physiological Implications of Novel Functional Interactions. Bioscience Reports, 20:51-91

Moghadam M, Firoozabadi M, Janahmadi M (2008). 50 Hz alternating extremely low frequency magnetic fields affect excitability, firing and action potential shape through interaction with ionic channels in snail neurons. Environmentalist. 28, 341–347

Moghadam M, Firoozabadi M, Janahmadi M (2011). Effects of weak environmental magnetic fields on the spontaneous bioelectrical activity of snail neurons. J. Membr. Biol. 240, 63-71

Müller P, Ahmad M (2011). Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception. *J Biol Chem.* 286(24):21033-40

Munhoz C, Kawamoto E, de Sá Lima L, Lepsch L, Glezer I, Marcourakis T, Scavone C (2005). Glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum. *Cell Biochem Funct.* 23(2):115-23

Nathanson J, Scavone C, Scanlon C, McKee M (1995). The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. *Neuron* 14(4):781-94

Nedeljkovic M, Kartelija G, Radenovic L, Todorovic N (2005). The effect of cooling on the acetylcholine-induced current of identified *Helix pomatia* Br neuron. *Journal of comparative physiology A-Neuroethology sensory neural and behavioral physiology*, 191 (5): 455-460

Nikolic L, Rokic M, Todorovic N, Kartelija G, Nedeljkovic M, Zakrzewska J (2010). Effect of alternating the magnetic field on phosphate metabolism in the nervous system of *Helix pomatia*. *Biol Res* 43:243–250

Paupardin-Tritsch D, Hammond C, Gerschenfeld H (1986). Serotonin and cyclicGMP both induce an increase of the calciumcurrent in the same identified molluscan neurons. *J Neurosci* 6:2715–2723

Peng L, Arystarkhova E, Sweadner K (1997). Plasticity of Na,K-ATPase isoform expression in cultures of flat astrocytes: species differences in gene expression. *Glia* 24(3):257-71

Petrov E, Martinac B (2007). Modulation of channel activity and gadolinium block of MscL by static magnetic fields. *Eur Biophys J* 36(2):95-105

Picard F, Paquet MJ, Levesque J, Bélanger A, Auger M (1999). ³¹P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes. *Biophys J* 77(2):888-902

Polidori E, Zeppa S, Potenza L, Martinelli C, Colombo E, Casadei L, Agostini D, Sestili P, Stocchi (2012). V Gene expression profile in cultured human umbilical vein endothelial cells exposed to a 300 mT static magnetic field. *Bioelectromagnetics* 33:65–74

Pontiggia L, Winterhalter K, Gloor S (1998). Inhibition of Na,K-ATPase activity by cGMP is isoform-specific in brain endothelial cells. *FEBS Lett* 9;436(3):466-70

Post R, Jolly P (1957). The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*. 25(1):118-28

Post R, Kauer-Sant Anna M (2011). An Introduction to the Neurobiology of Bipolar Illnes Onset, Recurrence and Progression. In: Lakshmi N. Yatham, Mario Maj (ed), *Bipolar Disorder: Clinical and Neurobiological Foundations*, Wiley-Blackwell, pp 77

Potenza L, Martinelli C, Polidori E, Zeppa S, Calcabrini C, Stocchi L, Sestili P, Stocchi V (2010). Effects of a 300 mT static magnetic field on human umbilical vein endothelial cells. *Bioelectromagnetics* 31:630–639

Prina-Mello A, Farrell, Prendergast P, Campbell V, Coey J (2006). Influence of strong static magnetic fields on primary cortical neurons. *Bioelectromagnetics* 27:35–42

Pulver S, Griffith L (2010). Spike integration and cellular memory in a rhythmic network from Na⁺/K⁺ pump current dynamics. *Nat Neurosci* 13:53–59

Pusztai J, Detari L, Szenasi G (1976). Electrophysiological and morphological characteristics of neurons of the snail *Helix pomatia* L. In: Salanki J (ed), *Neurobiology of invertebrates*. Akademiai Kiado, Budapest, pp 111-121

Ramnanan C, Storey K (2006). Suppression of Na⁺/K⁺-ATPase activity during estivation in the land snail *Otala lactea*. *J Exp Biol* 209:677-688

Reinhard L, Tidow H, Clausen MJ, Nissen P (2012). Na⁺,K⁺-ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Cell Mol Life Sci* 2012

- Rittenhouse A, Price C** (1985). Peripheral axons of the parabolic burster neuron R15. Brain Res. 333: 330–335
- Rosen A** (1996). Inhibition of calcium channel activation in GH3 cells by static magnetic fields. Biochimica et Biophysica Acta 1282:149-155
- Rosen A, Lubowsky J** (1987). Magnetic field influence on central nervous system function. Exp. Neurol. 95, 679–687
- Rosen AD, Lubowsky J** (1990). Modification of spontaneous unit discharge in the lateral geniculate body by a magnetic field. Exp Neurology 108:261-265
- Rosen A** (2003) a. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. Cell Biochem Biophys 39(2):163-73
- Rosen A** (2003) b. Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na⁺ channels in GH3 cells. Bioelectromagnetics 24(7):517-23
- Rozsa K** (1984). The pharmacology of molluscan neurons. Prog Neurobiol 23(1-2):79-150
- Ruch S, Nishio M, Wasserstrom J** (2003). Effect of Cardiac Glycosides on Action Potential Characteristics and Contractility in Cat Ventricular Myocytes: Role of Calcium Overload. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 307(1):419-28
- Saini H, Dhalla N** (2007) Sarcolemmal cation channels and exchangers modify the increase in intracellular calcium in cardiomyocytes on inhibiting Na⁺-K⁺-ATPase. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293:H169-H181
- Sakharov D, Salanki J** (1969). Physiological and pharmacological identification of neurons in central nervous system of Helix pomatia L. Acta physiol. Acad. Sci. Hung. 35: 19-30.
- Salanki J, S-Rozsa K, Vadasz J** (1979). Synaptic and metabolic modulation of the bimodal pacemaker activity in the R-pal neuron of Helix pomatia L. Comp. Biochem. Physiol. A 64: 265–271

Sanders A, Schaefer D, Joines W (1980). Microwave effects on energy metabolism of rat brain. *Bioelectromagnetics* 1:171-181

Skou J (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim.Biophys. Acta* 23: 394–401

Solov'yov I, Mouritsen H, Schulten K (2010). Acuity of a cryptochrome and vision-based magnetoreception system in birds. *Biophys J.* 99(1):40-9

Steiner U, Ulrich T (1989). Magnetic field effects in chemical reactions and related phenomena. *Chem. Rev* 89: 51–147

Stewart C, Pekala P, Lieberman E (1998). Acute and chronic regulation of Na⁺/K⁺-ATPase transport activity in the RN22 Schwann cell line in response to stimulation of cyclic AMP production. *Glia* 23(4):349-60

Stojilković S (2006). Pituitary cell type-specific electrical activity, calcium signaling and secretion. *Biol Res* 39: 403-423

Strumwasser F (1968). Membrane and intracellular mechanism governing endogenous activity in neurons. In: Carlson F (ed), *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice Hall, NJ, pp 329-341

Strumwasser F (1971). The cellular basis of behavior in *Aplysia*. *J Psychiatr Res* 8(3):237-57

Stubbs M, Van den Boogaart A, Bashford C, Miranda P, Rodrigues L, Howe F, Griffiths J (1996). ³¹P-magnetic resonance spectroscopy studies of nucleated and non-nucleated erythrocytes; time domain data analysis (VARPRO) incorporating prior knowledge can give information on the binding of ADP. *Biochim Biophys Acta* 1291:143-148

Su H, Alroy G, Kirson ED, Yaari Y (2001). Extracellular Calcium Modulates Persistent Sodium Current-Dependent Burst-Firing in Hippocampal Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 21(12):4173–4182

Swadner K (2008). A third mode of ouabain signaling. Focus on “Regulation of ERK1/2 by ouabain and Na-K-ATPase-dependent energy utilization and AMPK activation in parotid acinar cells”. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C588–C589

Tauc L (1955). Response of the nerve cell of the abdominal ganglion of *Aplysia punctata* activated by synaptic route. *J Physiol* 47(1):286-7

Tauc L (1967). Transmission in invertebrate and vertebrate ganglion. *Physiol. Rev* 47:521-593

Teodori L, Albertini M, Uguccioni F, Falcieri E, Rocchi M, Battistelli M, Coluzza C, Piantanida G, Bergamaschi A, Magrini A, Mucciato R, Accorsi A (2005). Static magnetic fields affect cell size, shape, orientation, and membrane surface of human glioblastoma cells, as demonstrated by electron, optic, and atomic force microscopy. *Cytometry A* 69(2):75-85

Therien A, Blostein R (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C541-C566

Thomas R (1969). Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neuron during extrusion of injected sodium. *J Physiol* 201:495–514

Thomas R (1974) Intracellular pH of snail neurons measured with a new pH-sensitive glass microelectrode. *J Physiol* 238:159-180

Todorović D, Kalauzi A, Prolić Z, Jović M, Mutavdžić D (2007). A method for detecting the effect of magnetic field on activity changes of neuronal populations of *Morimus funereus* (Coleoptera, Cerambycidae). *Bioelectromagnetics*. 28(3):238-41

Tohse N, Nakaya H, Takeda Y, Kanno M (1995). Cyclic GMP mediated inhibition of L-type Ca²⁺ channel activity by human natriuretic peptide in rabbit heart cells. *Br J Pharmacol* 114:1076–1082

Tsao J, Paramanathan N, Parkes H, Dunn J (1999). Altered brain metabolism in the C57BL/Wld mouse strain detected by magnetic resonance spectroscopy: association with delayed Wallerian degeneration? *J Neurol Sci* 168:1-12

Tsuji M, Allred E, Jensen F, Holtzman D (1995). Phosphocreatine and ATP regulation in the hypoxic developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 85:192-200

Vadasz I, Salanki (1976). In: Salanki, J (Ed.), *Mechanisms of Spike and Burst Generation in the Bimodal Pacemaker RPal Neuron of Helix pomatia L.* Akademiai Kiado, Budapest, pp 371-380

Wahler G, Rusch N, Sperelakis N (1990). 8-Bromo-cyclic GMP inhibits the calcium channel current in embryonic chick ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 68:531–534

Wang Y, Huang R (2004). Diurnal Modulation of the Na⁺/K⁺-ATPase and Spontaneous Firing in the Rat Retinorecipient Clock Neurons. *J Neurophysiol* 92: 2295–2301

Wang Y, Huang R (2006). Effects of Sodium Pump Activity on Spontaneous Firing in Neurons of the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *J Neurophysiol* 96: 109–118

Wang Z, Sarje A, Che P, Yarema K (2009). Moderate strength (0.23–0.28 T) static magnetic fields (SMF) modulate signaling and differentiation in human embryonic cells. *BMC Genomics* 10:356

Wang Z, Che P, Du J, Ha B, Yarema K (2010). Static magnetic field exposure reproduces cellular effects of the Parkinson's disease drug candidate ZM241385. *PLoS ONE* 5:e13883

Warschawski DE, Arnold AA, Beaugrand M, Gravel A, Chartrand É, Marcotte I (2011). Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1808(8):1957-74

Whiles J, Deems R, Vold R, Dennis E (2002). Bicelles in structure-function studies of membrane-associated proteins. *Bioorg Chem* 30(6):431-42

WHO (2006) a. Extremely low frequency fields. *Environmental Health Criteria* 238 Geneva, World Health Organization (WHO)

WHO (2006) b. Static Fields. *Environmental Health Criteria* 232 Geneva, World Health Organization (WHO)

Wieraszko A (2000). Dantrolene modulates the influence of steady magnetic fields on hippocampal evoked potentials in vitro. *Bioelectromagnetics* 21(3):175-82

Willis J, Gaubatz G, Carpenter D (1974). The role of the electrogenic sodium pump in modulation of pacemaker discharge of *Aplysia* neurons. *J Cell Physiol* 84:463-472

Willoughby D, Thomas RC, Schwiening C (1999). A role for Na^+/H^+ exchange in pH regulation in *Helix* neurons. *Pflugers Arch* 438:741-749

Wolsko P, Eisenberg D, Simon L, Davis R, Wallaczek J, Mayo-Smith M, Kaptchuk T, Phillips R (2004). Double-blind placebocontrolled trial of static magnets for the treatment of osteoarthritis of the knee: results of a pilot study. *Altern Ther* 10:36-43

Womack M, Khodakhah K (2004). Dendritic Control of Spontaneous Bursting in Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience*, April 7, 2004 • 24(14):3511-3521-3511

Wu Z, Li M, Chen J, Chi Z, Liu J (2006). Involvement of cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway in regulation of Na^+/K^+ -ATPase upon activation of opioid receptors by morphine. *Mol Pharmacol*. 69(3):866-76

Yang Y, Yan Y, Zou X, Zhang C, Zhang H, Xu Y, Wang X, Janos P, Yang Z, Gu H (2011). Static magnetic field modulates rhythmic activities of a cluster of large local interneurons in *Drosophila* antennal lobe. *J Neurophysiol* in press

Ye S, Yang J, Chen C (2004). Effect of static magnetic fields on the amplitude of action potential in the lateral giant neuron of crayfish. *Int J Radiat Biol* 80:699-708

Yingst D (1988). Modulation of the Na^+/K^+ -ATPase by Ca and intracellular proteins. *Annu Rev Physiol* 50:291-303

Yuan Z, Cai T, Tian J, Ivanov AV, Giovannucci DR, Xie Z (2005). Na^+/K^+ -ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex. *Mol Biol Cell* (9):4034-45

Zečević D, Levitan H (1980). Temperature acclimation: effects on membrane physiology of an identified snail neuron. *Am J Physiol.* 239(3):C47-57

Zhan R, Fujiwara N, Tanaka E, Shimoji K (1998). Intracellular acidification induced by membrane depolarization in rat hippocampal slices: roles of intracellular Ca²⁺ and glycolysis. *Brain Research* 780 (1): 86-94

Zhang S, Malmersjö S, Li J, Ando H, Aizman O, Uhlén P, Mikoshiba K, Aperia A (2006). Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. *J Biol Chem* 281(31):21954-62

Zsombok A, Schrofner S, Hermann A, Kerschbaum H (2005). A cGMP-dependent cascade enhances an L-type-like Ca²⁺ Current in identified snail neurons. *Brain Res* 1032:70–76

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/solids/ferro.html#c4>).

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/magnetic/elemag.html>

BIOGRAFIJA

Ljiljana Nikolić je rođena 13.08.1978. godine u Kragujevcu, gde je završila osnovnu školu i Prvu kragujevačku gimnaziju. Školske 1997/1998. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Opšta biologija. Studije je završila u februaru 2004. godine, sa srednjom ocenom 8,94. Školske 2007/2008. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Neuronauke, modul Neurofiziologija sa biofizikom. Od 2008. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od 2009. godine kao istraživač saradnik na Odeljenju za neurofiziologiju, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu. U okviru sporazuma o saradnji Akademija nauka i umetnosti Srbije i Češke, radila je u laboratoriji dr Hane Zemkove na odseku za Ćelijsku i molekularnu endokrinologiju u Pragu, 2010. godine. Trenutno radi na elektrofiziološkim sistemima za intracelularnu registraciju i merenje jonskih struja tehnikom nametnute voltaže na deliću membrane u ćelijama nervnog sistema, u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Dobitnik je nagrade fondacije Akademik Radoslav K. Anđus, 2012. godine. Član je društva biofizičara Srbije i Društva za neuronauke Amerike. Autor je i koautor više publikacija. Rezultati predstavljeni u doktorskoj disertaciji publikovani su u radovima:

- **Nikolić L, Kartelija G, Nedeljković M. 2008.** Effect of static magnetic fields on bioelectric properties of the Br and N1 neurons of snail *Helix pomatia*. *Comp Biochem Physiol A* 151(4):657-63
- **Nikolic L, Todorović N, Zakrzewska J, Stanić M, Rauš S, Kalauzi A, Janać B, 2012.** Involvement of Na^+/K^+ pump in fine modulation of bursting activity of the snail Br neuron by 10 mT static magnetic field. *J Comp Physiol A* 198(7):525-40